



Središnja medicinska knjižnica

Hojsak, Iva (2010) *Lactobacillus GG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u kolektivu.*
Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/857>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Iva Hojsak

Lactobacillus GG u prevenciji
gastrointestinalnih i respiratornih
infekcija u hospitalizirane djece i
djece u kolektivu

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena na Klinici za pedijatriju Klinike za dječje bolesti Zagreb i Dječjem vrtiću Matija Gubec u Zagrebu

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Sanja Kolaček, dr. med.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Sanji Kolaček na stručnom vodstvu i poticanju na rad; specijalizantima pedijatrije i ostalom osoblju Klinike za dječje bolesti Zagreb te djelatnicima Dječjeg vrtića Matija Gubec, posebice ravnateljici prof. Lidiji Vuković i VMS Vedrani Čabraji jer bez njih ovaj rad ne bi bio moguć; kompaniji Dukat na donaciji pripravaka bez uplitanja u znanstveni rad studije; prof. dr. sc. Hanii Szajewskoj na kritičkoj reviziji studije; dr. Milanu Miloševiću na statističkoj analizi.

Naposljetku, zahvaljujem se Zrinjki, Olegu, Alemki i Slaveni na prijateljskoj podršci i pomoći.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Imunost probavnog sustava	2
1.1.1. Prirođeni/nespecifični imunološki sustav	2
1.1.2. Stečeni imunološki odgovor	4
1.1.3. Kako nastaje imunološka tolerancija	7
1.2. Crijevna flora	9
1.2.1. Razvoj i sastav crijevnne flore	9
1.2.2. Uloga crijevnne flore	12
1.2.2.1. Metabolička uloga	12
1.2.2.2. Trofička uloga	13
1.2.2.3. Zaštitna uloga	14
1.2.3. Međudjelovanje između crijevnne flore i crijevnne imunosti	15
1.3. Probiotici	18
1.3.1. Povijesni osvrt	18
1.3.2. Definicije	20
1.3.3. Mehanizmi djelovanja	24
1.3.3.1. Blokiranje djelovanja patogenih bakterija	25
1.3.3.2. Regulacija imunološkog odgovora crijevnne sluznice	26
1.3.3.3. Regulacija funkcije crijevnog epitela	30
1.3.4. Moguća klinička primjena	31

<i>1.3.5. Probiotici u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija</i>	36
1.3.5.1. Prevencija nozokomijalnih infekcija	36
1.3.5.2. Prevencija gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u dječjem kolektivu.....	37
<i>1.3.6. Sigurnost probiotika</i>	38
<i>1.3.7. Nozokomijalne infekcije</i>	39
<i>1.3.8. Infekcije u dječjem kolektivu</i>	40
 2. HIPOTEZA	 41
<hr/>	
 3. CILJEVI	 44
<hr/>	
<i>3.1. Cilj rada</i>	<i>45</i>
<i>3.2. Doprinos i očekivana primjena istraživanja</i>	<i>46</i>
 4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	 47
<hr/>	
<i>4.1. Ispitanici</i>	<i>48</i>
<i>4.2. Ispitivani pripravci</i>	<i>50</i>
<i>4.3. Plan istraživanja i istraživačke metode</i>	<i>52</i>
<i>4.4. Parametri ishoda</i>	<i>53</i>
4.4.1. Primarni parametri ishoda	54
4.4.2. Sekundarni parametri ishoda	55
<i>4.5. Statističke metode</i>	<i>58</i>

4.6. Određivanje veličine uzorka	59
4.6.1. Istraživanje na Klinici za pedijatriju	59
4.6.2. Istraživanje u vrtiću	59
4.7. Odobrenja	60
4.7.1. Etička povjerenstva	60
4.7.2. Dodatna odobrenja	60
 5. REZULTATI	 62
<hr/>	
5.1. Rezultati – Uloga LGG u prevenciji nozokomijalnih infekcija	63
5.1.1 Ispitanici	63
5.1.2. Ukupan broj nozokomijalnih infekcija	67
5.1.3. Rezultati primarnih ishoda	68
5.1.4. Rezultati sekundarnih ishoda – gastrointestinalne infekcije	69
5.1.4.1. Broj epizoda povraćanja i proljeva	69
5.1.4.2. Težina infekcije	70
5.1.4.3. Uzroci gastrointestinalnih infekcija	71
5.1.5. Rezultati sekundarnih ishoda – respiratorne infekcije	72
5.1.5.1. Vrste respiratornih infekcija	72
5.1.5.2. Težina i trajanje respiratornih infekcija	72
5.1.6. Trajanje hospitalizacije	74
5.1.7. Izračunavanje prediktivnih čimbenika – gastrointestinalne infekcije	75
5.1.8. Izračunavanje prediktivnih faktora – respiratorne infekcije	76

5.1.9. Podanaliza po dobnim skupinama	77
5.1.9.1. Dobna skupina 1-5 godina	78
5.1.9.2. Dobna skupina 6-10 godina	79
5.1.9.3. Dobna skupina 11-15 godina	80
5.1.9.4. Dobna skupina 16-18 godina	81
5.2. Rezultati – Uloga LGG-a u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece u kolektiv	82
5.2.1. Ispitanici	82
5.2.1.1. Ukupan broj respiratornih infekcija	85
5.2.1.2. Ukupan broj gastrointestinalnih infekcija	86
5.2.2. Rezultati primarnih ishoda	87
5.2.3. Rezultati sekundarnih ishoda – respiratorne infekcije	88
5.2.3.1. Vrste i broj respiratornih infekcija	88
5.2.3.2. Težina respiratornih infekcija	91
5.2.4. Rezultati sekundarnih ishoda – gastrointestinalne infekcije	93
5.2.5. Rezultati sekundarnih ishoda – izostanak iz vrtića	96
5.2.6. Izračunavanje prediktivnih faktora – respiratorne infekcije	97
5.2.7. Izračunavanje prediktivnih faktora – gastrointestinalne infekcije	98
5.3. Nuspojave	99
 6. RASPRAVA	 100
6.1. Probiotici u prevenciji nozokomijalnih infekcija	103

6.1.1. <i>Prevenција gastrointestinalnih infekcija na dječjim bolničkim odjelima</i>	103
6.1.2. <i>Prevenција respiratornih infekcija na dječjim bolničkim odjelima</i>	106
6.1.3. <i>Podanaliza po dobnim skupinama</i>	108
6.1.4. <i>Duljina trajanja hospitalizacije</i>	108
6.2. <i>Prevenција infekcija u dječjem kolektivu</i>	109
6.3. <i>Nuspojave</i>	115
6.4. <i>Klinička primjenjivost dobivenih rezultata</i>	116
6.4.1. <i>Klinička primjenjivost probiotika u dječjim bolnicama</i>	118
6.4.2. <i>Klinička primjenjivost probiotika u dječjem kolektivu</i>	120
 7. ZAKLJUČCI	 121
<hr/>	
8. SAŽETAK	125
<hr/>	
9. SUMMARY	128
<hr/>	
10. LITERATURA	131
<hr/>	
11. PRILOZI	158
<hr/>	
12. ŽIVOTOPIS	175
<hr/>	

Popis oznaka i kratica

Ang4	angiogenin 4
CFU	<i>Colonyforming Units</i> ; koloniformne jedinice
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> ; protein povezan s citotoksičnim T limfocitima
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ESPGHAN	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i> ; Europsko društvo za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i> ; limfni sustav crijeva
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> ; čimbenik stimulacije kolonije granulocita
IL-	interleukin-
INF- γ ,	interferon gama
ISRCTN	<i>International Standard Randomized Controlled Trial Number Register</i>
I κ B	inhibitor NF- κ B
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i> ; bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
MCH II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i> ; antigen tkivne podudarnosti II
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i> ; receptori u citosolu

	imunoloških stanica
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells</i> ; transkripcijski faktor
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ; dijelovi stijenke mikroorganizma koji se vežu za receptore na stanicama imunološkog sustava
PI3K	fosfatidilinozitol -3'-kinaza
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> ; receptori na koje se vežu PAMP-ovi
p38/MAPK	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ; proteinske kinaze aktivirane mitogenima
sIgA	sekretorni imunoglobulin A
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i> ; transformirajući faktor rasta beta
Th1	<i>T helper 1</i> ; pomoćnički T limociti 1
Th2	<i>T helper 2</i> ; pomoćnički T limociti 2
Th3	<i>T helper 3</i> ; pomoćnički T limociti 3
TLR	<i>Toll Like Receptors</i> ; receptori na površini stanica imunološkog sustava
TNF α ,	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> ; čimbenik tumorske nekroze alfa
VSL#3	pripravak koji sadrži 8 različitih sojeva LAB
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

1.1. Imunost probavnog sustava

Najvažnija je uloga probavnog sustava prerađivanje i apsorpcija hranjivih tvari. Međutim, navedeno podrazumijeva prijelaz svih tih molekula kroz samo jedan sloj epitelnih stanica i njihov ulazak u naš organizam. Istodobno, probavnu cijev nastanjuje više bakterija nego li ukupno imamo tjelesnih stanica, stoga imunološki sustav crijeva mora biti u mogućnosti prepoznati potencijalo patogene mikroorganizme te spriječiti njihov ulazak putem poznate imunološke eliminacije i/ili ekskluzije. Osim toga mora omogućiti ulazak brojnih, nama potrebnih, makromolekula i na njih imunološki ne reagirati. Stoga nije čudno što se u probavnom sustavu nalazi 2/3 našeg imunološkog sustava, a ono po čemu je imunološki sustav crijeva jedinstven je njegova dvostruka funkcija: obrana i tolerancija(1) (slika 1).

1.1.1. Prirođeni (nespecifični) imunološki sustav

Prirođeni imunološki sustav je evolucijski sačuvan, prisutan je i kod vrlo primitivnih organizama, a omogućuje domaćinu brzi antimikrobni odgovor. Prirođeni imunološki odgovor je neovisan o prethodnoj izloženosti istom patogenu, a uključuje:

- A. **Crijevnu barijeru** ("*mucosal barrier*") koja podrazumijeva kiseli pH želuca, probavne enzime, nespecifične antimikrobne peptide (lizozime, laktoferin, defenzine), sluz na površini enterocita i propulzivnu

peristaltiku. Osim toga, tu se ubrajaju i mikroorganizmi koji čine crijevnu floru te epitelni sloj enterocita u kojem posebnu ulogu imaju mikrovili, stanična membrana enterocita i uski spojevi (engl. *tight junctions*). Ovi mehanizmi, kao prva linija obrane, služe kako bi ograničili broj mikroorganizama koji dolaze u dodir s crijevnim stanicama te ih dijelom usmrtili i ubrzali izbacivanje iz probavnog sustava (2).

B. Stanični dio prirođenog imuniteta čine enterociti i fagocitne stanice.

Enterociti na svojoj površini imaju niz prepoznavajućih receptora (*pattern recognition receptors*, PRR) kao što su receptori na površini - TLR (*toll like receptors*) ili u citosolu - NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) koji prepoznaju posebne dijelove stijenke potencijalno štetnog mikroorganizma tzv. PAMP-ove (*pathogen-associated molecular patterns*) koje čine lipopolisaharidi, flagelin, peptidoglikani, itd (3).

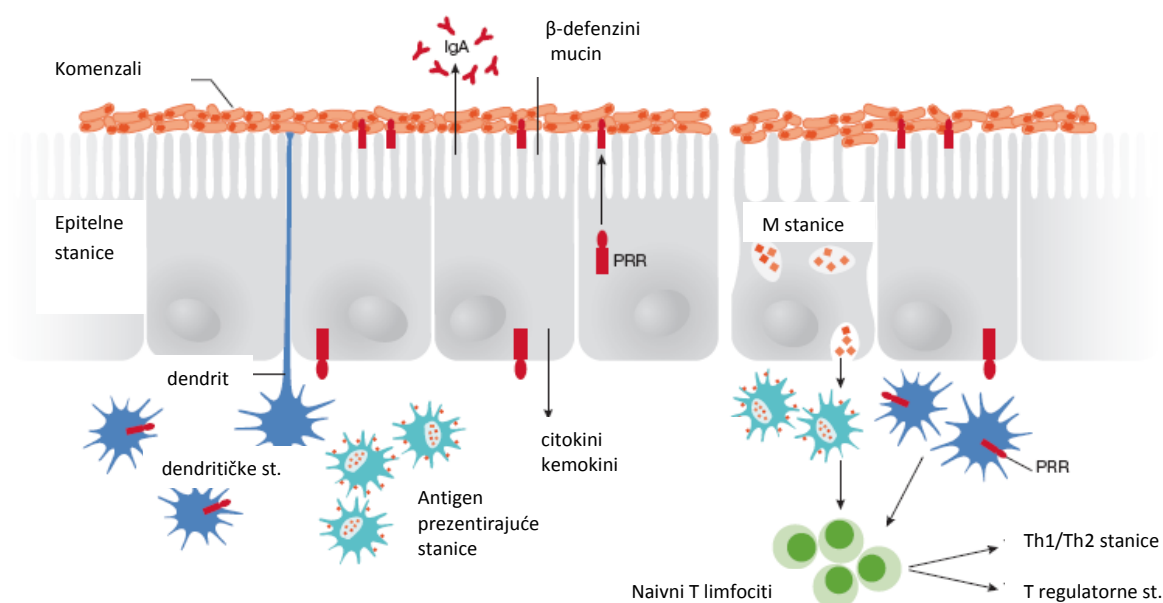
Nakon takvog prepoznavanja potencijalno štetnog mikroorganizma dolazi do aktivacije velikog broja transkripcijskih faktora, koji uključuju i jedan od važnijih - NF- κ B, i posljedično tome dovode do indukcije različitih gena koji su odgovorni za sintezu proinflamatornih citokina, kemokina i interferona koji upozoravaju organizam na prisustvo patogena (4).

Važno je napomenuti da se TLR ne nalaze samo na epitelnim stanicama, već i na stanicama koje imaju ključnu ulogu u stečenoj imunosti, kao što u dendritičke stanice, mastociti, T i B limfociti. Stoga je važno naglasiti da odvajanje prirođene i stečene imunosti ima ulogu jedino u lakšem shvaćanju imunosti i vrlo je pojednostavljeno. Danas se smatra da postoji kontinuum u imunološkom odgovoru čime se prvenstveno stavlja naglasak na vrlo složeno međudjelovanje različitih imunoloških stanica.

1.1.2. Stečeni imunološki odgovor

Stečeni imunološki odgovor najvećim je dijelom posredovan T limfocitima koji se nalaze u limfnom sustavu crijeva poznatim pod nazivom GALT (*gut associated lymphoid tissue*). On je po definiciji karakteriziran antigen-specifičnim pamćenjem. Reakcija specifične imunosti puno je sporija od one prirođene, međutim, svaki će slijedeći susret s navedenom patogenim mikroorganizmom polučiti sve snažniji i brži imuni odgovor. Stečeni imunološki odgovor crijeva ima brojne funkcije, od stvarnja IgA do poticanja specifičnog imunološkog odgovora koji može biti lokalni, u crijevu, ali i sustavni. GALT nije anatomski dobro ograničen organ. Riječ je, zapravo, o složenoj mreži imunoloških stanica duž cijelog crijeva, kojeg čine izolirani limfociti u lamini proprij ili unutar samog epitela, ali i o onima koji su organizirani u limfatične strukture kao što su Payerove ploče koje su pokrivene M stanicama (5). Važnu ulogu u stečenom imunološkom odgovoru imaju antigen prezentirajuće stanice kao što su dendritičke stanice i makrofagi. Navedene antigen prezentirajuće stanice, nakon što migriraju u mezenteričke limfne

čvorove, prikazuju mikrobne peptide, preko MHC II (*major histocompatibility complex*) sustava, T limfocitima. Ovisno o citokinima, još nediferencirani CD4 T limfociti, biti će potaknuti na razvoj u jedan od tri smjera: Th1, Th2 ili regulatorne T limfocite. Th1 stanice karakterizira sekrecija, najvećim dijelom, INF- γ , IL-2 i TNF α , a sudjeluju u imunološkom odgovoru protiv unutarstaničnih mikroorganizama. S druge strane, Th2 stanice luče slijedeće interleukine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13, a sudjeluju u humoralnom odgovoru te dovode do stvaranja specifičnih imunoglobulina (6). Regulatorni T limfociti putem lučenja IL-10 i TGF- β (*transforming growth factor beta*) ostvaruju učinkovitu imunosupresiju te su stoga najvažniji u postizanju oralne tolerancije i uspostavljanju ravnoteže između međusobno suprotstavljenih imunih mehanizama - Th1 i Th2 (7).



Slika 1. Imunološki odgovor u crijevu. Enterociti na površini luče više medijatora upale kao odgovor na brojne antigene, što uključuje antibakterijske peptide, sekretorni IgA i kemokine. Specijalizirane epitelne stanice (M stanice), transportiraju antigene do antigen prezentirajućih stanica, koje ih prezentiraju naivnim T limfocitima. PRR na enterocitima i dendritičkim stanicama posreduju u otkrivanju bakterijskih antigena, a dendritičke stanice oblikuju imunološki odgovor ili toleranciju ovisno o tome potiču li efektorne ili regulatorne T limfocite (8, *uz dozvolu*).

1.1.3. Kako nastaje imunološka tolerancija

Postoje dvije grane imunološke tolerancije u crijevu: oralna tolerancija i tolerancija na vlastitu crijevnu floru (9). Oralna tolerancija vrhunac je imunoloških sposobnosti crijevne sluznice, a definira se kao izostanak imunološke reakcije, stanične i humoralne, na progutane tvari koje bi polučile imuni odgovor kada bismo ih primijenili sustavno (10), a tolerancija na vlastitu crijevnu floru odnosi se na sposobnost da komenzalni mikroorganizmi opstaju u crijevu domaćina bez pobuđivanja stečene imunosti (11,12). Novija saznanja, najviše iz područja prirođene imunosti, pokazuju da oralna tolerancija može biti posredovana dendritičkim stanicama, ali i direkto preko TLR ili regulatornih T limfocita. Dva su mehanizma, koja se danas smatraju ključnima u nastanku oralne tolerancije:

1. Klonalna delecija i anergija (13,14). Ingestija velike količine antigena može dovesti do delecije i inaktivacije antigen specifičnih T stanica. Anergija T limfocita odnosi se na stanje u kojima postoji smanjen imunološki odgovor, odnosno, najvećim dijelom smanjeno stvaranje IL-2. Stimulacija receptora na T limfocitima bez kostimulacijskih molekula na antigen prezentirajućim stanicama, ali i signalizacija preko CTLA-4 (proteina povezanih s citotoksičnim T limfocitima) dovodi do anergije T limfocita (12,15).
2. Imunosupresija posredovana regulatornim T limfocitima. Prepoznatljivi regulatorni mehanizmi posredovani podtipovima regulatornih T limfocita, koji uključuju Th3, T regulatorne 1 stanice i CD4+CD25+ T stanice, moduliraju

i suprimiraju stečeni Th1 i Th2 odgovor. Smatra se da je djelovanje Th3 i T regulatornih 1 stanica nastaje pojačanom proizvodnjom TGF- β i IL-10 citokina, dok CD4+CD25+ regulatorne T stanice ostvaruju svoj učinak direktnim kontaktom preko CTLA-4 i TGF- β vezanog za membranu. Ovaj način vezan uz regulatorne T limfocite smatra se odgovornim za razvoj tolerancije na komenzalnu crijevnu floru (12,16,17,18).

Na koji način naše imunološke stanice, koristeći TLR sustav, prepoznaju komenzalne bakterije kao „dobre“ i na njih ne reagiraju, a reagiraju i uništavaju patogene bakterije je fascinantno i do danas neobjašnjeno. Budući da komenzalne bakterije, kao i patogene, sadrže veliki broj kombinacija TLR liganda (antigena), možda upravo ta kombinacija govori našem organizmu je li bakterija dobroćudna ili ne (12,19,20). Literatura danas govori o ulozi TLR4 u indukciji tolerancije na crijevne bakterije, najviše zbog činjenice da oralna tolerancija nije moguća u pokusnih životinja koje navedeni receptor nemaju (21). Međutim, o navedenom će biti više riječi kasnije.

Cijeli mehanizam oralne tolerancije vrlo je složen, a da je vrlo važan govori i činjenica da se danas upravo promjene u mehanizmima djelovanja stanica upletenih u oralnu toleranciju smatraju odgovornim za nastanak različitih bolesti kao što su nutritivne alergije, celijakija, upalne bolesti crijeva itd.

1.2. Crijevna flora

Pojam crijevna flora odnosi se na skupinu živih mikroorganizama u probavnoj cijevi domaćina (22). Ljudsko je crijevo prirodno stanište za brojne, različite vrste mikroorganizama, većinom bakterija, koje su se prilagodile životu na crijevnoj površini ili u lumenu crijeva (23). Crijevne bakterije 10 puta nadmašuju ukupan broj naših, eukariotskih, stanica te se smatra da crijevna flora ima vrlo važnu metaboličku aktivnost te se ponaša kao virtualni organ u našem tijelu (24,25).

Broj bakterija se povećava prema distalnom dijelu probavnog sustava, tako da želudac i dvanaesnik nastanjuje mali broj mikroorganizama, manje od 10^3 koloniformnih jedinica (CFU-*colonyforming units*) na gram crijevnog sadržaja jer kiselina, žuč i probavni enzimi ubijaju najveći broj bakterija, čime se smanjuje mogućnost njihovog prijanjanja za epitel. Broj bakterija se od jejunuma prema ileumu proporcionalno povećava, od 10^4 do 10^7 CFU na gram sadržaja, s predominacijom gram negativnih aerobnih bakterija. Suprotno tome, debelo je crijevo gusto naseljeno anaerobima, a broj bakterija penje se i do 10^{12} CFU s 500-600 različitih vrsta bakterija, međutim tek 30-40 vrsta čini 99% ukupne populacije (23).

1.2.1. Razvoj i sastav crijevne flore

Fetus u maternici pliva i pije sterilnu plodovu vodu. Nakon poroda, izloženost porodnom kanalu, fekalni sadržaj, koža i medicinsko osoblje, određuju prvu crijevnu

floru, koju u početku čine fakultativni aerobi (26). Ovakav *milje* odgovara vrstama kao što su *Enterobacter* i *Streptococcus spp* koji koloniziraju crijevo u prvih nekoliko dana života, a zatim, do kraja prvog tjedna života prerastaju *Bifidobacterium* i *Bacteroides spp* (27).

Čimbenici koji utječu na kolonizaciju crijeva su, u prvom redu, tip poroda (vaginalni ili carski rez) i tip prehrane (majčino mlijeko ili dojenačke formule) (28,29,30,31). Djeca rođena carskim rezom imaju manje „dobročudnih“ anaeroba kao što su *Bacteroides* i *Bifidobacterium*, a više *Clostridium sp* u odnosu na djecu rođenu vaginalnim putem. Značajne razlike nađene su ovisno o tipu prehrane: dojena djeca ne samo da dobivaju imunoregulatorne tvari u majčinom mlijeku, već imaju korist i od metaboličke (esencijalne masne kiseline) i prebiotičke (oligosaharidi) funkcije mlijeka, što modificira crijevnu floru. S druge strane, djeca hranjena dojenačkom formulom imaju ukupno veći broj komenzalnih bakterija, koje su, isto tako, šire rasprostranjene, a uključuje koliformne bakterije, *Streptococcus sp*, *Clostridium difficile*, i ostale vrste klostridija (26). Promjene su zamijećene i ovisno o uporabi antibiotika tijekom dojenačkog razdoblja. Dojenčad koja je primala antibiotike ima više vrsta bakterija roda *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter*, a manji broj koliformnih bakterija, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* (32). Osim toga, antibiotici uništavaju vlastitu floru čime omogućuju kolonizaciju i proširenje manje poželjnih vrsta (26). Ostali okolišni čimbenici, kao što su visoki higijenski standardi, doveli su do odgode prerastanja crijevne flore te čak i do nestanka određenih skupina bakterija u novorođenčadi (27).

Kada započine dohrana i prehrana krutom hranom, crijevna flora postaje sve sličnija onoj u odraslih (33).

Treba naglasiti da su prve bakterije koje se nastanjuju crijevo najvažnije, one mogu mijenjati ekspresiju gena u epitelnim stanicama domaćina i na taj način stvarati sebi odgovarajući okoliš, ali i zaustavljati rast ostalih bakterija koje kasnije ulaze u ekosustav (23).

Što se tiče vrsta bakterija, istraživanja su pokazala da anaerobne bakterije premašuju aerobne, odnosno da ih je 100 do 1000 puta više. Najveći broj ih je iz roda *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* i više anaerobnih gram pozitivnih koka. Bakterije koje se nalaze u manjem broju uključuju *Enterococcus* i *Enterobacteriaceae*. Svaka osoba ima nekoliko stotina vrsta bakterija koje pripadaju navedenim rodovima, s točno određenom kombinacijom vrsta koje predominiraju i potpuno su različite nego u drugih ljudi (34). Iako podvrste i broj bakterija variraju tijekom vremena, rodovi i vrste bakterija crijevne flore ostaju relativno stabilni tijekom života. Međutim, u određenim stanjima kao što su proljev, uporaba antibiotika i promjene u prehrani, sastav crijevne flore se može mijenjati (34,35,36), štoviše, promjene u crijevnoj flori, u mnogim slučajevima prethode razvoju bolesti (37).

1.2.2. Uloga crijevne flore

Koliko je crijevna flora važna pokazala su i ispitivanja na životinjama koje su uzgojene u sterilnim uvjetima. Kod tih su životinja, u usporedbi s onima uzgojenim u normalnim uvjetima, nađene promjene u različitim anatomskim i fiziološkim funkcijama. Masa pojedinih organa (srca, pluća i jetre), udarni volumen srca, debljina crijevne stijenke, razina gamaglobulina i limfni čvorovi su reducirani i atrofični u životinja koje su uzgojene u sterilnim uvjetima, što upućuje na zaključak da crijevna flora ima vrlo značajnu ulogu u razvoju domaćina (38,39,40).

Uloga crijevne flore može se podijeliti u tri kategorije (41):

- 1) metabolička,
- 2) trofička,
- 3) zaštitna.

1.2.2.1. Metabolička uloga

Metabolička uloga crijevne flore sastoji se od fermentacije neprobavljenih sastojaka hrane i endogene sluzi. Genska različitost unutar bakterijskog ekosustava osigurava različitost enzima i biokemijskih putova koji su različiti od domaćinova. Rezultat ove složene metaboličke aktivnosti je, za domaćina, obnavljanje metaboličke energije i apsorpcija tvari koje se inače, bez bakterija, ne mogu apsorbirati, ali s druge strane, osigurava energiju i hranjive tvari za rast i razmnožavanje bakterija. Razgradnja

ugljikohidrata je vodeći izvor energije za bakterijski rast u kolonu, osim toga razgradnjom tvari nastaju i kratkolančane masne kiseline koje može apsorbirati domaćin (41). Navedeno rezultira u spašavanju energije dobivene iz hranjivih tvari, ali i pomaže u apsorpciji kalcija, magnezija i željeza u cekumu. Metaboličke funkcije također rezultiraju nastankom nekih vitamina, kao što su vitamin K, B12, biotin, folna kiselina te sintezom aminokiselina iz amonijaka ili uree (42,43).

Nedavno je dokazano da komenzalne bakterije potiču apsorpciju monosaharida te pohranu triglicerida u adipocitima, zatomiujući pri tome čimbenik adipocita potaknut glađu, što je imalo važnu ulogu u evoluciji, ali danas može biti jedan od čimbenika koji utječu na pretilost (44).

1.2.2.2. Trofička uloga

Crijevne bakterije mogu kontrolirati proliferaciju i diferencijaciju epitelnih stanica, čemu govori u prilog i činjenica da je obnavljanje epitelnih stanica smanjeno u kriptama kolona životinja koje su uzgojene u sterilnim uvjetima (22). Isto tako nađeno je da ekspresiju različitih gena u genomu čovjeka možemo povezati s različitim vrstama bakterija, štoviše, „Intersection Human Genome Sequencing Consortium“ je identificirao 223 proteina bakterijskog podrijetla koji su sad dio ljudskog genoma (45).

Bakterije imaju ključnu ulogu u razvoju i crijevne i sustavne imunosti.

Životinje uzgojene u sterilnim uvjetima imaju manju gustoću limfnih stanica crijevnoj sluznici, limfni folikuli su mali, a cirkulirajuće razine imunoglobulina su niske. Odmah

nakon izlaganja životinja mikrobima, broj sluzničnih limfocita se povećava, stvaraju se germinativni centri u limfatičnim folikulima i dolazi do povećanja razine imunoglobulina u serumu (46,47). Mehanizmi djelovanja crijevnne flore na sustavnu imunost nisu poznati, no, smatra se da učinak na sustavnu imunost nastaje zbog prisutnosti topivih produkata mikroorganizama u krvi koji aktiviraju TLR sustav perifernih imunoloških stanica što posljedično modificira sustavni imunološki odgovor (48).

1.2.2.3. Zaštitna uloga

Zaštitna uloga predstavlja barijeru koja sprječava ulazak patogenih bakterija, odnosno crijevna flora čini ključnu liniju obrane kojom se sprječava kolonizacija patogenih bakterija. Nekoliko je mehanizama upleteno u djelovanje barijere, a uključuju kompetitivnu ekskluziju (natjecanje za nutrijente, prostor), osiguranje funkcioniranja crijevne barijere, stimulaciju sekrecije slgA, stvaranje mukoidnog sloja i stvaranje antimikrobnih supstanci – bakteriocina, čime se aktivno zaustavlja upala (49,50,51).

Tablica 1. Uloga crijevne flore.

1. Metabolička	Sinteza vitamina
	Stvaranje kratkolančanih masnih kiselina
2. Trofička	Stimulacija epitelne proliferacije, angiogeneze i obnavljanja epitela
	Citoprotektivni učinak
	Stimulacija razvoja imunološkog sustava
3. Zaštitna	Regulacija prirodene imunosti
	Regulacija stečene imunosti
	Kompetitivni učinak za patogene

1.2.3. Međudjelovanje između crijevne flore i crijevne imunosti

Crijevna sluznica je velika barijera, površine od 250 do 300 m², između imunološkog sustava i vanjskog svijeta. Stoga nije niti čudno da GALT sadrži najveći broj (2/3) imunokompetentnih stanica ljudskog tijela (52). Odmah nakon izlaganja crijevne sluznice mikrobima, broj se intraepitelnih limfocita značajno povećava, germinativni centri brzo se stvaraju unutar limfnih folikula te dovode do sekrecije imunoglobulina čija se razina u serumu značajno povećava (53,54,55). Mnoga različita međudjelovanja između mikroba, epitela i GALT-a uključena su u stvaranje imunološkog pamćenja. Crijevna flora ima značajnu ulogu u nastanku oralne tolerancije, što je dokazano u

miševa uzgojenih u sterilnim uvjetima koji reagiraju na ingestiju nutrijenata stvarajući veliku količinu imunoglobulina E i zadržavajući Th2 obrazac odgovora. Zanimljivo je da se navedeno može ispraviti obnavljanjem crijevne flore, no, samo u novorođenih, ali ne i u starijih miševa (56).

Sposobnost kojom se razlikuju patogene bakterije od komenzala dijelom je posredovana već navedenim PRR (TLR i NOD), međutim, točan način na koji naš imunološki sustav prepoznaje da se ne radi o patološkim bakterijama nije poznat (11). Poznato je da komenzali smanjuju stvaranje proinflammatoryh citokina modulirajući aktivnost enterocitnih čimbenika transkripcije, u prvom redu NF- κ B koji sudjeluju u sintezi proinflammatoryh citokina, kemokina i adhezijskih molekula (57,58). Aktivnost NF- κ B regulira inhibitorna molekula citosola, inhibitor NF- κ B (I κ B), čije raspadanje blokiraju komenzalne bakterije te na taj način inhibiraju stvaranje citokina (57). Sadašnji dokazi pokazuju da komenzali mogu potaknuti lučenje sekretornog IgA koji pogoduje odvajanju mikroba s luminalne strane epitela (59). Tome u prilog govori činjenica da crijevna flora kod miša uzgojenog u sterilnim uvjetima direktno dovodi do produkcije sekretornog IgA, kojeg izlučuju B stanice neovisno o T limfocitima i unatoč nedostatku germinativnih centara u limfnim folikulima (60). Ovi podaci upućuju na postojanje evolucijski vrlo starog puta kojim nezreli B limfociti mogu producirati sekretorni IgA na periferiji, međutim način na koji crijevna flora uzrokuje promjenu klase imunoglobulina koji luče B stanice nije jasan, ali se smatra da nastaje neovisno o receptoru na B limfocitima, a ovisno o TGF- β ili TNF sustavu (61,62,63).

Međudjelovanje crijevne flore i imunosti vidljivo je i iz činjenice da u nedostatku sekretornog IgA komenzalne bakterije prerastaju, imaju povećan pristup crijevnom epitelu i mogu otkočiti nenormalan sustavni imunološki odgovor (9).

1.3. Probiotici

1.3.1. Povijesni osvrt

Dokumentirani podaci o pozitivnom učinku bakterija na zdravlje čovjeka datiraju iz perzijske verzije Starog Zavjeta (Postanak 18:8) u kojem je navedeno „Abraham duguje svoju dugovječnost pijenju kiselog mlijeka“ (64). Plinijus, rimski povjesničar iz 76. godine prije Krista preporučuje uporabu fermentiranih mliječnih pripravaka u liječenju gastritisa (65).

U 16. stoljeću zbilježeno je da je kralj Francis I od Francuske ozdravio od teške bolesti nakon što je konzumirao jogurt načinjen od kozjeg mlijeka.

1900. godine Moro je prvi izolirao bakteriju koja luči mliječnu kiselinu iz stolice dojenčadi. Bakterija je kasnije nazvana *Lactobacillus acidophilus* (u početku nazvana *Bacillus acidophilus*) (66).

Međutim, znanstveni interes za jogurt kao namirnicu koja ima pozitivan učinak na zdravlje započeo je Elie Metchnikoff, ruski znanstvenik, dobitnik Nobelove nagrade, koji je 1908. godine predložio tezu da konzumacija jogurta koji sadržavaju *Lactobacillus*, smanjuje broj patogenih bakterija stvarajući kiseli milje. U svojoj poznatoj „Autointoksikacijskoj teoriji“ smatrao je da se ljudski organizam polagano truje toksinima iz hrane te da postupno slabi zbog proliferacije crijevnih patogenih bakterija čiji se broj može smanjiti uporabom fermentiranih mliječnih pripravaka. Svoje istraživanje temeljio je na proučavanju seljaka iz Bugarske koji su živjeli dugo (više od

87 godina, početkom 20-tog stoljeća), a upotrebljavali su velike količine fermentiranih mliječnih pripravaka u prehrani. Bakteriju koja se nalazila u tom jogurtu nazivao je bugarski bacilus, koja se danas naziva *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* (66).

Bifidobakterije, druga skupina bakterija, otkrivena je krajem 19. stoljeća, a Tissier je otkrio da su one predominantne crijevne bakterije u dojene dojenčadi te se mogu preporučiti u liječenju dojenačkog poljeva (67).

Njemački profesor Alfred Nissle je 1917. godine izolirao soj *Escherichia coli* iz stolice vojnika koji nije obolio od enterokolitisa tijekom epidemije šigeloze. Nissle je kasnije koristio taj soj s određenim uspjehom u akutnim infektivnim intestinalnim bolestima (68).

Ranih 20-tih godina 20-tog stoljeća Rettger objavljuje da mlijeko koje sadržava *L. acidophilus* ima terapijski učinak. On je, naime, vjerovao da je njihov pozitivan učinak vezan uz kolonizaciju crijeva i prerastanje navedenih bakterija (69).

Napokon, 1930. godine Shirota je prvi izolirao soj "dobrih" crijevnih bakterija koje su nakon ingestije uspjele žive doći do crijeva, te su bakterije nazvane u početku *Lactobacillus acidophilus* Shirota, a nakon toga *Lactobacillus casei* Shirota i prvi je soj koji se od 1935. godine koristi u komercijalne svrhe (70). Nakon toga uslijedio je razvoj velikog broja bakterija za koje se tvrdilo da imaju pozitivan učinak na zdravlje. Tako je i 1983. godine izoliran *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) iz crijeva zdrave osobe (71).

Otkrili su ga Sherwood Gorbach i Barry Goldin (soj je dobio ime po prvim slovima njihovih prezimena - GG) (72). U početku je soj nazvan *L. acidophilus* GG, ali je kasnije

utvrđeno da se radi o soju *L. rhamnosus*. Soj je rezistentan na kiselinu i žuč, dobro prijanja na crijevni epitel i proizvodi mliječnu kiselinu (73).

1.3.2. Definicije

Pojam probiotik dolazi od grčkih riječi *pro+bios* što znači “za život” i smatra se da ga je prvi put upotrijebio Kollath 1953. godine kada je opisivao organske i anorganske dodatke hrani koji su potrebni za očuvanje zdravlja bolesnika koji boluju od malnutricije (74).

Lilly and Stillwell su 1965. godine opisali probiotike kao “supstance koje izlučuje jedan mikroorganizam, a koje stimuliraju rast drugog mikroorganizma” te su ih na taj način suprotstavili pojmu antibiotika (75).

Sperti je 1971. definirao probiotike kao ekstrakte tkiva koji stimuliraju rast mikroorganizama, dok je prvu definiciju, koja je slična današnjoj, upotrijebio Parker koji ih je definirao kao organizme i supstance koji dovode do ravnoteže u crijevnim mikrobima (76,77). Takva općenita definicija nije bila zadovoljavajuća jer je uključivala riječ supstance, te u se zbog toga u tu kategoriju ubrajali brojni dodaci, uključujući i antibiotike. Stoga je 1989. godine Fuller revidirao definiciju ističući važnost da se radi o živim organizmima te je predložio definiciju koju je, međutim, ograničio na životinje, a glasila je “živi mikroorganizmi koji imaju pozitivan učinak na životinje poboljšavajući ravnotežu crijeвне flore” (78).

Havenaar 1992. godine definirao probiotike kao „žive mono ili miješane kulture mikroorganizama koji, ako se daju ljudima ili životinjama, imaju pozitivan učinak na domaćina poboljšavajući vlastitu mikrofloru“ (79).

Međutim, i dalje se tragalo za točnom definicijom te je Salminen 1996. godine dao definiciju po kojoj su probiotici „žive kulture mikroba ili dijetetski proizvodi koji sadrže navedene kulture i imaju pozitivan učinak na zdravlje i prehranu domaćina“ (80).

Definiciju je revidirao 1998. u slijedeću „probiotici su živi mikroorganizmi ljudskog podrijetla, koji se upotrebljavaju kao dodatak hrani ili farmaceutski pripravci, koji preživljavaju prolazak kroz gornji dio gastrointestinalnog sustava, prolazno koloniziraju crijevo adhezijom za crijevni epitel i imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina“ (81). Napokon FAO/WHO dali su definiciju po kojoj su probiotici „živi mikroorganizmi koji, ako se konzumiraju u odgovarajućoj dozi kao dodatak hrani, imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina“ (82).

Bakterije koje se upotrebljavaju kao probiotici moraju zadovoljiti nekoliko kriterija.

Moraju biti (83):

- ljudskog podrijetla,
- nepatogeni,
- rezistentni na probavljanje tijekom prolaza kroz probavni trakt,
- živi do dolaska u debelo crijevo,
- stabilni u kiselom mediju i otporni na žuč,
- sposobni prijanjati na epitel,

- opstati u probavnom sustavu,
- producirati antimikrobne substance,
- modulirati imunološki sustav,
- utjecati na metabolizam.

Najčešće upotrebljavani probiotici su bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu (LAB), a pretežito su iz roda *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium*. Međutim i ostale ne-LAB bakterije (najčešće iz roda *Escherichia*, *Enterococcus* i *Bacillus*), kao i nepatogene gljive, imaju probiotička svojstva (83).

Mikroorganizmi koji se smatraju probioticima prikazani su u tablici 2 (84).

Tablica 2. Do sada poznati mikroorganizmi s probiotičkim djelovanjem.

<i>Lactobacillus</i> vrste	<i>Bifidobacterium</i> vrste	Ostale LAB	Ne-LAB bakterije i gljive
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var.
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	toyoi
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	strain Nissle
<i>L. delbrueckii</i> subsp.	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			<i>Saccharomyces</i>
<i>L. johnsonii</i>			<i>cerevisiae</i>
<i>L. paracasei</i>			<i>Saccharomyces</i>
<i>L. plantarum</i>			<i>boulardii</i>
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Dokazano je da učinak probiotika ne ovisi samo o njegovoj vrsti već i o upotrebljavanoj dozi. Pripravak probiotika mora sadržavati određeni minimum kolonija po dozi (number of colony-forming units (CFU)) da postigne učinak (85). Smatra se da pozitivni učinak probiotika nije moguć bez dnevnog unosa od 10^6 do 10^{10} CFU (86). Za terapijski učinak

nužne su više doze probiotika, 10^9 do 10^{10} CFU, dok se u preventivne svrhe upotrebljavaju doze od 10^6 do 10^9 CFU (87).

1.3.3. Mehanizmi djelovanja

Već je rečeno da je za normalno funkcioniranje ljudskog organizma potrebna crijevna flora, međutim, potrebno je još jednom naglasiti slijedeće:

- a) kolonizacija probavnog sustava bakterijama započinje odmah nakon rođenja (23),
- b) ljudski organizam posjeduje 10 puta veći broj bakterijskih nego eukariotskih stanica (88,89,90),
- c) iako su bakterije rasprostranjene duž cijelog gastrointestinalnog sustava, broj im se postupno povećava (91),
- d) procjenjuje se da bakterije čine 35–50% sadržaja debelog crijeva čovjeka (92),
- e) crijevna flora potiče i održava oralnu toleranciju te je poznati antigeni stimulus za razvoj i sazrijevanje crijevnog limfnog sustava (93).

Upravo su saznanja da crijevne bakterije imaju važnu ulogu u crijevnoj imunosti otvorila mogućnost za razvoj koncepta o uporabi probiotika u terapijske svrhe. Danas je velik broj istraživanja kojima se pokušava otkriti točan mehanizam njihova djelovanja.

Dokazan je direktni antimikrobni učinak, poboljšanje funkcije crijevne barijere i imunomodulacijska aktivnost preko učinka i na stečenu i na prirođenu imunost (94,95).

Učinak probiotika je višestruk i karakterizira ga djelovanje na više razina, a uključuje:

- 1) blokiranje djelovanja patogenih bakterija,
- 2) regulaciju imunološkog odgovora crijevne sluznice,
- 3) regulaciju funkcije crijevnog epitela.

1.3.3.1. Blokiranje djelovanja patogenih bakterija

A. Lučenje antibakterijskih supstanci

Probiotici imaju direktan učinak na patogene bakterije produkcijom antibiotskih supstanci, koje uključuju bakteriocine i različite kiseline (96,97). Jednu vrstu antibakterijskih supstanci predstavljaju lantibiotici, bakteriocini koje stvaraju gram-pozitivne bakterije, kao što je *Lactococcus lactis*, a koji su aktivni i u vrlo niskim koncentracijama zaustavljajući rast patogena tako da djeluju na lipid II komponentu bakterijske stijenke (98).

Ostali bakteriocini su mali antimikrobni peptidi koje luče laktobacili. Ovi peptidi imaju relativno uzak spektar djelovanja i najviše su toksični za gram-pozitivne bakterije, uključujući streptokoke, stafilokoke, listeriju, ali i mikobakterije. Osnovni mehanizam djelovanja bakteriocina je stvaranje pora u citoplazmi osjetljivih bakterija, međutim mogu i djelovati na njihovu enzimsku aktivnost (99).

Isto tako, nekoliko podvrsta bifidobakterija proizvode bacteriocinu slične tvari koje su toksične i za gram pozitivne i gram negativne bakterije (100).

Probiotici, posebice laktobacili, proizvode octenu, mliječnu i mravlju kiselinu koja snižava lokalni pH, čime se inhibira rast širokog spektra gram negativnih bakterija (101).

B. Kompetitivna inhibicija patogena i toksina

Probiotici u probavnom sustavu smanjuju prijanjanje i patogenih bakterija i njihovih toksina na crijevni epitel. Nekoliko podvrsta laktobacila i bifidobakteria se natječe s patogenima bakterijama za vezna mjesta na epitelu te na taj način mogu maknuti patogenu bakteriju iako je već vezana za epitel i prije primjene probiotika (102,103).

Vezanje bakterija na intestinalni epitel odvija se preko bakterijskih lektina i ugljikohidrata, a vežu se na glikokonjugirane receptore stanične površine.

Istraživanjima se, stoga, pokušava utvrditi mogu li probiotici blokirati točno određenu patogenu bakteriju vežući se na navedene receptore (104,105,106).

Na sličan način odvija se i blokiranje enterotoksina, koji je također jedan od mehanizama odgovornih za djelovanje probiotika (99).

1.3.3.2. Regulacija imunološkog odgovora crijevnice

Probiotici međudjeluju s dendritičkim stanicama i epitelnim stanicama, započinjući odgovor posredovan makrofagima te T i B limfocitima (98). *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da probiotici imaju učinak na imunološki sustav domaćina: pojačavaju imunološki odgovor, mogu poboljšati sposobnost borbe protiv infekcije, smanjuju

stvaranje tumora, te mogu smanjiti nastanak alergija i crijevne upale (98). Djelovanje se odvija na načine prikazane u daljnjem tekstu.

A. Pojačavanje prirodene imunosti domaćina

Kao što je već spomenuto, prirodna imunost sprječava prodor i patoloških i komenzalnih mikroorganizama, a probiotici imaju sposobnost poticanja prirodene imunosti. Crijevne dendritičke stanice mogu obuzdati komenzalne bakterije selektivno aktivirajući B limfocite na proizvodnju sekretornog IgA (sIgA) koji smanjuje prodor bakterija kroz sluznicu (99,108,109,110). Djelovanje dendritičkih stanica na komenzale ograničeno je na crijevnu sluznicu čime se smanjuje potencijalni sustavni imunološki odgovor (6). Uporaba probiotika može pojačati prirodni imunološki odgovor, što pokazuju i studije kojima je dokazano da *B. animalis* podiže koncentraciju fekalnog sIgA u dojenčadi (112). Zanimljivo je da uz značajno povećanje fekalnog sIgA, LGG podiže i ukupnu razinu IL-6 na periferiji koji onda pojačava IgA odgovor na sluznici (113).

B. Moduliranje patogenom potaknutog imunološkog odgovora

Prirodni imunološki odgovor mora biti jačine koja odgovara razini prijetnje pojedinog patogena. Jedna od značajnijih uloga probiotika je i njihovo djelovanje na smanjenje pretjeranog imunološkog odgovora tako da uravnotežuju proizvodnju pro- i antiinflamatornih citokina (99,114,115,116,117). Sazrijevanje dendritičkih stanica rezultira povećanom proizvodnjom citokina i očitovanjem molekula potrebnih za

aktivaciju T i B limfocita. Većina istraživanja su pokazala da probiotici potiču dendritičke stanice na proizvodnju antiinflamatornih citokina, uključujući IL-10, koji suprimira Th1 odgovor (118,119,120). Tako *Bifidobacterium infantis* i *Lactobacillus* spp nisu uspjeli blokirati proizvodnju Th1-citokina, IL-12 i INF- γ u IL-10 *knockout* miševa (121,122,123). Osim što potiču stvaranje antiinflamatornih citokina, probiotici suprimiraju nastajanje proinflamatornih citokina. LGG kultura stanica smanjuje stvaranje TNF-a u makrofagima, potičući stvaranje vrlo velike količine čimbenika stimulacije kolonije granulocita (granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)) koji onda suprimiraju proizvodnju TNF-a (124,125). Pojedine podvste probiotika djeluju tako da smanjuju stvaranje IL-6 i INF- γ u monocitima periferne krvi (126) ili inhibiraju progresiju ciklusa razvoja T limfocita (127).

C. Poticanje imunološkog odgovora protiv infekcije

Probiotici također stimuliraju imunološki odgovor domaćina, što uključuje Th1 odgovor posredovan dendritičkim stanicama. Istraživanja su pokazala da tijekom kolonizacije crijevne sluznice miša s *B. fragilis*, dendritičke stanice vežu i zadržavaju bakterijske polisaharide koji onda potiču sazrijevanje dendritičkih stanica, stvaranje Th1 citokina, uključujući IL-4, IL-12 i IFN- γ (59), dok laktobacili u dendritičkim stanicama potiču stvaranje IL-12, IL-18 i INF- γ (128).

D. Regulacija imunološkog odgovora probiotičkom DNA

Uz gore navedene direktne učinke probiotika na imunološke stanice, i DNA probiotika

modulira imunološki odgovor. DNA izolirana iz VSL#3 smanjuje proizvodnju IL-8 te TNF- α i IFN- γ *in vivo* i *in vitro*. VSL#3 DNA također inhibira p38 MAP kinazu i odgađa NF- κ B aktivaciju (129). Nemetilirani dinukleotidi CpG, koji se često nalaze u bakterijskom genomu, aktiviraju prirodenu imunost preko TLR9 (130).

E. Aktivacija TLR sustava

Kao i patogene, tako i probiotičke bakterije imaju PAMP-ove koje prepoznaju TLR, ali probiotici ne započinju patogeni imunološki odgovor. Različiti probiotici djeluju preko različitih TLR-ova (131). Tako na primjer, T stanice kultivirane s *E. coli* Nissle 1917 izražavaju povećani broj TLR2 i TLR4. Suprotno tome, mješavina probiotika VSL#3 ne potiče imunološki odgovor bez TLR9, znači da je TLR9 put značajan za ove probiotike (132). Sve navedeno upućuje na zaključak da različiti probiotici stimuliraju točno određene TLR na stanicama domaćina, što ima vrlo važnu ulogu u njihovoj mogućoj terapijskoj primjeni.

Budući da je poznato da i probiotici i patogene bakterije djeluju preko TLR-ova važno je otkriti zašto probiotici, za razliku od patogenih bakterija, ne potiču imunološku kaskadu. Smatra se da u tome sudjeluju slijedeći čimbenici:

- probiotici djeluju na TLR-ove na određenim dijelovima polarizirane epitelne stanice, na primjer, dokazano je da apikalna, ali ne i bazolateralna stimulacija TLR9 na epitelnim stanicama inhibira NF- κ B aktivaciju (133);
- probiotici sadržavaju neke jedinstvene dijelove koje patogene bakterije nemaju, a koji djeluju na različitu aktivaciju TLR (134);

- stanični odgovor potaknut probioticima može nastati i zbog sinergističnog djelovanja s više TLR, koji ne postoji ili je drugačije reguliran kod patogenih bakterija (135).

1.3.3.3. Regulacija funkcije crijevnog epitela

Crijevni je epitel ključan u održanju normalne funkcije crijeva pružajući obranu od patogenih mikroba i detritusa u crijevnom sadržaju. Brojni dokazi upućuju da probiotici stimuliraju reakcije crijevnog epitela, uključujući i obnavljanje oštećene crijevne barijere, stvaranje antibakterijskih supstanci i proteina koji štite epitel te blokiraju citokinima potaknutu staničnu apoptozu (99):

A. Funkcija crijevne barijere

Funkcija crijevne barijere, važnog obrambenog mehanizma crijevnog epitela, zahtijeva funkcionalne uske spojeve tzv. *tight junctions* između epitelnih stanica. Novija istraživanja su pokazala da probiotici potiču oporavak crijevne barijere nakon ozljede. Na primjer, probiotik *E. coli* Nissle 1917 potiče stvaranje uskih spojeva (*tight junctions*) (136), LGG vrši translokaciju *tight junction* kompleksa (137), a slično djeluju i ostali probiotici (138).

B. Stvaranje citoprotektivnih tvari

Crijevni epitel regulira mikrookoliš stvaranjem citoprotektivnih supstanci. *Heat shock* proteini, čije lučenje potiče stres, stalno su prisutni u epitelnim stanicama čime čuvaju

homeostazu i smanjuju njegovo oštećenje. Dokazano je da određene topive tvari u LGG kulturi potiču sintezu citoprotektivnih *heat shock* proteina u crijevnim epitelnim stanicama (139). Isto tako, drugi antimikrobni peptidi, kao što su β -defenzini, koje sintetiziraju epitelne stanice kako bi spriječile invaziju i prijanjanje patogenih bakterija, nastaju pod utjecajem *E. coli* Nissle 1917, ali i VSL#3 preko regulacije NF- κ B transkripcijskog puta (140). Uz β -defenzine, probiotici potiču i oslobađanje drugih antimikrobnih supstanci, npr. *B. thetaiotaomicron* stimulira oslobađanje angiogenina 4 (Ang4), koji djeluje baktericidno na različite patogene (141).

C. Prevencija citokinima potaknute apoptoze

Još jedan potencijalni mehanizam koji se pripisuje probioticima je sprječavanje oštećenja epitela uzrokovanog citokinima. LGG sprječava citokinima potaknutu apoptozu (programiranu smrt stanice) crijevnog epitela stimulirajući put ovisan o fosfatidilinozitol -3'-kinazi (PI3K) i inhibirajući aktivaciju p38/MAPK (98). Čini se da je ova antiapoptotična aktivnost LGG-a posredovana i preko dva nova proteina (p75 i p40) (141).

1.3.4. Moguća klinička primjena

U posljednjih 20 godina učinjena su brojna klinička istraživanja o utjecaju probiotika na velik broj kliničkih indikacija, koje uključuju slijedeće (82):

1. Infektivni proljev
2. Infekcija *Helicobacterom pylori*
3. Upalne bolesti crijeva
4. Karcinomi
5. Opstipacija
6. Alergije
7. Kardiovaskularne bolesti
8. Vaginitis uzrokovan bakterijama
9. Vaginitis uzrokovan gljivicama
10. Infekcije mokraćnih putova

Dosadašnja istraživanja, provedena na velikom broju bolesnika i nakonadno učinjene metaanalize dokazale su da probiotici imaju znanstveno dokazanu ulogu u liječenju i prevenciji određenih bolesti. Nedavno su izdane i smjernice o uporabi probiotika „Recommendations for Probiotic Use—2008” u kojima su indikacije podijeljene u tri kategorije: A - imaju klinički dokazanu ulogu, B – mogu se preporučiti, međutim postoje studije u kojima pozitivan učinak nije zamijećen i C – za sada se, zbog nedostatka dokaza, ne mogu preporučiti (143).

Kategorijom „A” obilježene su slijedeće indikacije:

1. Liječenje vodenog proljeva. Rezultati velikih kliničkih studija pokazuju značajno poboljšanje u liječenju akutnog vodenog, u prvom redu rotavirusnog proljeva,

najviše u dojenčadi i male djece. Za učinak je značajno slijedeće: a) skraćuje trajanje proljeva za 17-30 sati; b) ovisan je o soju probiotika (LGG je najučinkovitiji); c) ovisan je o dozi (učinkovita je doza viša od 10^9 CFU); d) korisni su kod vodenog proljeva i virusnog gastroenteritisa, ali ne i za bakterijski proljev; e) učinkovitiji su ako se upotrijebe u ranoj fazi bolesti; f) učinkovitiji su u djece u razvijenim zemljama.

Slijedom navedenog, preporuča se primjena laktobacila (LGG, *L. reuteri* i *L. acidophilus*) ili *S. boulardii* u akutnom vodenom proljevu u dozama koje nisu niže od 10^{10} CFU na dan tijekom prvih 5 dana bolesti (83,144,145,146).

2. Prevenција proljeva uzrokovanog antibiotikom. LGG i *S. boulardii* su učinkoviti u prevenciji antibiotikom uzrokovanog proljeva. Nove metaanalize randomiziranih kontroliranih studija potvrdile su njihovu učinkovitost u djece i u odraslih. Iako ne postoje točne upute o njihovoj primjeni i budući da se radi o samoograničavajućoj bolesti, sadašnje smjernice preporučuju da se navedeni sojevi upotrebljavaju samo kada kliničar ocijeni da je to važno (83,147,148,149,150,151,152).
3. Prevenција i održanje remisije u bolesnika s pouchitisom. Značajan dio bolesnika s ulceroznim kolitisom nakon kolektomije i formiranja ileoanalnog poucha razviti će pouchitis, koji je vrlo teško i spriječiti i liječiti. Rezultati randomiziranih kliničkih studija podupiru uporabu probiotika VSL#3 u visokim dozama u primarnoj i sekundarnoj prevenciji pouchitisa u odraslih. U toj indikaciji valja ih uporabiti nakon početnog antibiotskog liječenja, ili odmah nakon formiranja

poucha. Podaci o učinkovitosti probiotika u djece još ne postoje

(83,153,154,155).

4. Prevenција atopijskih bolesti. Primjena LGG-a u trudnica i majki dojilja te njihove djece tijekom prvih nekoliko mjeseci života sprječava nastajanje alergije u djece rizične za razvoj atopijskih bolesti (83).

Kategorije B i C navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Smjernice o uporabi probiotika (142).

Indikacija	Kategorija
1. Proljev	
Infekcijski (odrasli) – liječenje	A
Infekcijski (djeca) – liječenje	A
Prevenција infekcije	B
Prevenција antibiotikom uzrokovanog proljeva	A
Liječenje rekurentnog poljeva uzrokovanog <i>Cl. difficile</i>	B
Prevenција proljeva uzrokovanog <i>Cl. difficile</i>	B
2. Upalne bolesti crijeva	
Pouchitis	
Prevenција i održanje remisije	A
Indukcija remisije	C
Ulcerozni kolitis	
Indukcija remisije	C
Održavanje remisije	C
Crohnova bolest	C
3. Iritabilni kolon	B
4. Atopijski ekcem	
Liječenje	A
Prevenција	A
5. Radijacijski enteritis	C
6. Vaginitis/vaginoza	C

1.3.5. Probiotici u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija

Jedina indikacija u prevenciji infekcija koja se spominje u sadašnjim preporukama, a što je vidljivo iz tablice 3, je prevencija proljeva. Navedena indikacija uvrštena je u kategoriju B, znači da se probiotici mogu preporučiti, međutim postoje istraživanja u kojima pozitivan učinak nije zamijećen. Druge indikacije, odnosno uloga probiotika u prevenciji respiratornih infekcija, nisu navedene, jer se obzirom na nedostatak dokaza ne mogu uvrstiti niti u jednu od navedenih kategorija.

Budući da je prevencija infekcija probioticima predmet ovog istraživanja, rezultate dosadašnjih istraživanja prikazati ćemo detaljnije.

1.3.5.1. Prevencija nozokomijalnih infekcija

Do sada su objavljene 4 randomizirane kontrolirane studije o ulozi probiotika u prevenciji proljeva u hospitalizirane djece. Od navedene četiri studije, dvije studije rabile su LGG, a druge dvije kombinaciju *B. bifidum* (sada nazvanu *B. lactis*) i *S. thermophilus* (156,157,158,159). Istraživanja su uključila mali broj hospitalizirane djece, provedena su u djece do 3 godine starosti i dala su oprečne rezultate. Slijedom navedenog zaključuje se da danas nema dovoljno dokaza kojima bi se poduprijela preporuka o uporabi probiotika u cilju prevencije gastrointestinalnih nozokomijalnih infekcija (83).

S druge strane, ne postoje relevantna istraživanja o ulozi probiotika u prevenciji nozokomijalnih respiratornih infekcija. Provedena su istraživanja samo u bolesnika liječenih u jedinicama intenzivne njege, a samo je jedno provedeno u djece. Istraživanje je provedeno na nedovoljnom uzorku, s velikim brojem odustalih ispitanika i u kritično bolesne djece, a rezultatima nije dokazan pozitivan učinak LGG-a u prevenciji pneumonije (160,161).

1.3.5.2. Prevencija gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u dječjem kolektivu

Djeca koja pohađaju vrtić pod povećanim su rizikom od razvoja gastrointestinalnih i respiratornih infekcija. Njihovo bi sprječavanje bilo od velikog značaja i za obitelji i za društvo, te stoga predstavlja jedan od najvećih izazova preventivne pedijatrijske medicine (162). Budući da je poznato da kontinuirana uporaba probiotika modificira imuni odgovor, smatra se da bi mogla prevenirati infektivne bolesti u djece u kolektivu. Navedeno je bio i razlog zbog kojeg je do sada provedeno nekoliko istraživanja kojima se isto pokušalo dokazati (163, 164,165,166).

Nažalost, navedene studije najvećim su dijelom ograničene na mali broj ispitanika, a provedene metaanalize upućuju na postojanje tek blagog pozitivnog učinka nekih probiotskih sojeva (83). Slijedom navedenog, znanstveni dokazi nisu dovoljni da se uporaba probiotika preporuči u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u zdrave djece.

1.3.6. Sigurnost probiotika

Pitanja sigurnosti primjene probiotika, što je posebice značajno u pedijatrijskoj populaciji, odnose se na:

- prijenos antibiotske rezistencije,
- prijenos drugog nepoželjnog genetskog materijala,
- uzrok infekcije.

Iako su prijenos antibiotske rezistencije ili drugog genetskog materijala teoretski mogući, do sada provedena predklinička i klinička istraživanja nisu potvrdila navedene nuspojave probioticima koji su trenutno u uporabi (167).

Što se tiče infektivnog potencijala, iako su se probiotici u svim dosadašnjim istraživanjima pokazali sigurnim, nekoliko je pojedinačnih opisa probiotikom uzrokovanih infekcija. U posljednjih nekoliko godina postoje podaci da su različiti sojevi probiotika uzrokovali endokarditis, bakterijemiju ili lokalne infekcije (168,169,170,171), a postoje i izvješća o infekcijama i u dojenčadi i male djece (172,173,174,175,176,177). Velika većina tih bolesnika imala je podležću bolest zbog koje su bili skloni infekcijama (npr. Centralni venski kateter, tešku srčanu grešku, imunomodulatornu terapiju), a i u većine su mikroorganizmi bili iz bolesnikove crijevne flore, a ne iz probiotskog pripravka. Vrlo je mali broj slučajeva kod kojih je mikroorganizam povezan s uporabom komercijalnih preparata s probiotikom (178,179,180,181,182).

Zanimljivo je da u Finskoj, u kojoj je uporaba probiotika u hrani naglo porasla, nije zabilježena povećana učestalost bakterijemija uzrokovanim probioticima (LGG) (183).

Budući da dosadašnji podaci upućuju da je rizik od infekcije probioticima vrlo mali, odnosno jednak riziku od infekcije vlastitom crijevnom florom, Europsko je društvo za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (ESPGHAN) donijelo zaključak da se rizik može smatrati zanemarivim, izuzev u ozbiljno imunokompromitiranih bolesnika (184).

1.3.7. Nozokomijalne infekcije

Nozokomijalne infekcije definiraju se kao infekcije koje se javljaju u bolesnika za vrijeme boravka u bolnici, a koje kod prijema nisu bile u fazi inkubacije ili koje se razvijaju nakon hospitalizacije, ali je obzirom na duljinu trajanja inkubacije, infekcija nastala u bolnici (185). Najčešće se nozokomijalnim infekcijama smatraju one koje nastaju 48h nakon prijema u bolnicu. Na njihov nastanak utječu brojni čimbenici, kao što su: smanjen imunološki odgovor kod dijela bolesnika, prenapučenost odjela, prevladavanje rezistentnih sojeva, različiti dijagnostički i terapijski postupci, medicinsko osoblje i posjete (186). U bolnicama se upotrebljavaju brojne mjere kojima bi se spriječile nozokomijalne infekcije, a one uključuju: higijenske mjere osoblja, odgovarajuću izolaciju bolesnika, sterilizaciju, edukaciju osoblja i epidemiološki nadzor (187).

Unatoč bitnom napretku i svim navedenim mjerama, učestalost nozokomijalnih infekcija, poglavito u pedijatrijskoj populaciji i dalje je visoka te u razvijenim zemljama

iznosi 5-44% (187,188,189). Od svih nozokomijalnih infekcija prevladavaju crijevne infekcije, čija je incidencija 4,5 do 22,6% (190,191,192) i respiratorne infekcije, čija je učestalost 13 do 53% (193). Svaka ta infekcija produžuje boravak u bolnici, pogoršava ishod liječenja osnovne bolesti te, stoga, bitno povisuje troškove liječenja (194,195).

1.3.8. Infekcije u dječjem kolektivu

S druge strane, nužno je naglasiti da djeca koja pohađaju kolektiv (vrtić) također imaju povišen rizik od razvoja infekcija. On je čak 2-3 puta veći u djece koja pohađaju vrtić u odnosu na onu djecu koja ostaju kod kuće (196). Povećan rizik od infekcije ima značajne socijalne i ekonomske implikacije najviše stoga što, obzirom na učestalost infekcija, podiže troškove liječenja, ali i povećava bolovanje roditelja (197,198,199). Štoviše, niti jedna od poduzetih javnozdravstvenih i epidemioloških mjera (higijena, kontrole djece od strane nadležnih liječnika, pregledi epidemiološke službe, sanitarna kontrola djelatnika, zatvaranje dječjih vrtića itd.) nije smanjila navedenu incidenciju te do danas nema odgovarajućih mjera prevencije (195).

2. HIPOTEZA

Rezimirajući podatke navedene u Uvodu, znanstvenma i stručna utemeljenost našeg istraživanja ogleda se u slijedećem:

1. Ispitivanja su potvrdila imunomodulatorni učinak probiotika – interakcija probiotika s crijevnom sluznicom i crijevnim imunološkim sustavom dovodi ne samo do modulacije lokalnog imunološkog odgovora, već ima utjecaj i na sustavni imunološki odgovor.
2. Nozokomijalne infekcije i infekcije u dječjem kolektivu veliki su problem, a dosad primjenjivane preventivne mjere nisu dale odgovarajuće rezultate.
3. Nedostaju smjernice utemeljene na dokazima – do sada nisu provedena dovoljno velika istraživanja kojima bi se utvrdila preventivna uloga probiotika u sprječavanju gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u kolektivu.

Naš je cilj, stoga bio procijeniti preventivnu učinkovitost i sigurnost primjene LGG-a u hospitalizirane djece i djece u kolektivu te, na kraju, dati smjernice o primjeni probiotika u navedenim indikacijama.

HIPOTEZE:

1. Uporaba *Lactobacillus GG* značajno smanjuje rizik od gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece.
2. Uporaba *Lactobacillus GG* značajno smanjuje rizik od gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece u kolektivu.

3. CILJEVI

3.1. Cilj rada

Opći ciljevi ovog istraživanja su slijedeći:

- procijeniti preventivni učinak probiotika na broj gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece tijekom intervencijskog razdoblja
- procijeniti preventivni učinak probiotika na broj gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece u kolektivu tijekom intervencijskog razdoblja
- utvrditi sigurnost njihove primjene u odabranim skupinama ispitanika

Specifični ciljevi su:

1. Odrediti broj gastrointestinalnih infekcija: proljev, povraćanje
2. Odrediti broj infekcija gornjih dišnih putova: obična prehlada, faringitis, otitis
3. Odrediti broj infekcija donjih dišnih putova: bronhitis, bronhiolitis, pneumonija
4. Odrediti težinu gastrointestinalnih infekcija
5. Odrediti težinu respiratornih infekcija
6. Usporediti broj dana izostalih iz kolektiva u obje ispitivane skupine
7. Usporediti trajanje hospitalizacije u obje ispitivane skupine
8. Pratiti nuspojave i komplikacije koje bi se mogle povezati s uzimanjem LGG-a

3.2. Doprinos i očekivana primjena istraživanja

Učinkovitost probiotika u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece nedovoljno je istražena. Sva dosadašnja istraživanja rađena su na malom uzorku, a rezultati su nekonzistentni.

Ovim će se istraživanjem na dovoljno velikom broju ispitanika (najvećem do sada) ispitati učinkovitost probiotika u prevenciji nozokomijalnih gastrointestinalnih i respiratornih infekcija te istih infekcija u dječjem kolektivu. Rezultati, bili pozitivni ili negativni, pridonijet će zauzimanju stava temeljenog na znanstvenim dokazima o uporabi probiotika u gore navedenim indikacijama.

Osim znanstvenog doprinosa, eventualni pozitivni rezultat, tj. dokazana preventivna učinkovitost probiotika imat će i značajnije implikacije. Naime, glede velike učestalosti nozokomijalnih infekcija na pedijatrijskim odjelima te činjenice da djeca koja pohađaju kolektiv češće obolijevaju od respiratornih i gastrointestinalnih infekcija, eventualna prevencija omogućila bi:

- 1) kraće hospitalizacije,
- 2) manje troškove hospitalizacije,
- 3) smanjeni broj izostanaka djece iz vrtića i posredno kraćeg bolovanja roditelja.

4. ISPITANICI I METODE

Ovo je istraživanje randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana usporedba učinkovitosti LGG-a u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u odnosu na placebo.

Budući da se preventivna djelotvornost mjerila u dvije određene populacije – hospitalizirana djeca i djeca u kolektivu, tako je i istraživanje provedeno na dvije pozicije: a) u Klinici za dječje bolesti Zagreb i b) u dječjem vrtiću Matija Gubec. Dječji je vrtić odabran zbog slijedećih karakteristika: riječ je o vrtiću kojeg pohađa velik broj djece (400 djece), na 4 lokacije, ali su svi su objekti smješteni u jednoj gradskoj općini (Trešnjevci) te su stoga svi ispitanici bili iz sličnih socioekonomskih uvjeta.

4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na dvije različite pozicije, a uključeni su slijedeći ispitanici:

1. Svi bolesnici hospitalizirani na Klinici za pedijatriju Klinike za dječje bolesti Zagreb, u dobi od 12 mjeseci do 18 godina.
2. Sva djeca koja pohađaju dječji vrtić Matija Gubec u Zagrebu koji se nalazi na 4 lokacije na Trešnjevci, koja su bila u dobi od 12 mjeseci do 7 godina.

Sudjelovali su samo ispitanici čiji su roditelji ili zakonski skrbnici potpisali informirani pristanak i koji nisu imali niti jedan od isključujućih kriterija.

Isključujući kriteriji:

- Imunodeficijencija: uključuje sve ranije dijagnosticirane primarne imunodeficijencije, tj. stanje koje obuhvaća nedostatak jedne ili više grana imunološkog sustava;
- alergija na proteine kravljeg mlijeka (probiotici će se dati u fermentiranom mliječnom pripravku);
- uporaba pripravka koji sadrži prebiotik i/ili probiotik za vrijeme uključanja odnosno (7 dana prije uključanja);
- zloćudne bolesti;
- teške kronične bolesti - bolesti koje zahtijevaju sistemsku imunosupresivnu terapiju (autoimune bolesti, kao npr. kronične upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus, i sl.) te druge kronične bolesti koje dovode do izrazite pothranjenosti (malapsorpcijski sindromi, sindrom kratkog crijeva);
- odbojnost djeteta prema fermentiranim mliječnim pripravcima;
- za hospitaliziranu djecu – hospitalizacija kraća od 3 dana;

Nakon randomizacije svi su ispitanici bili podijeljeni u jednu od dvije skupine:

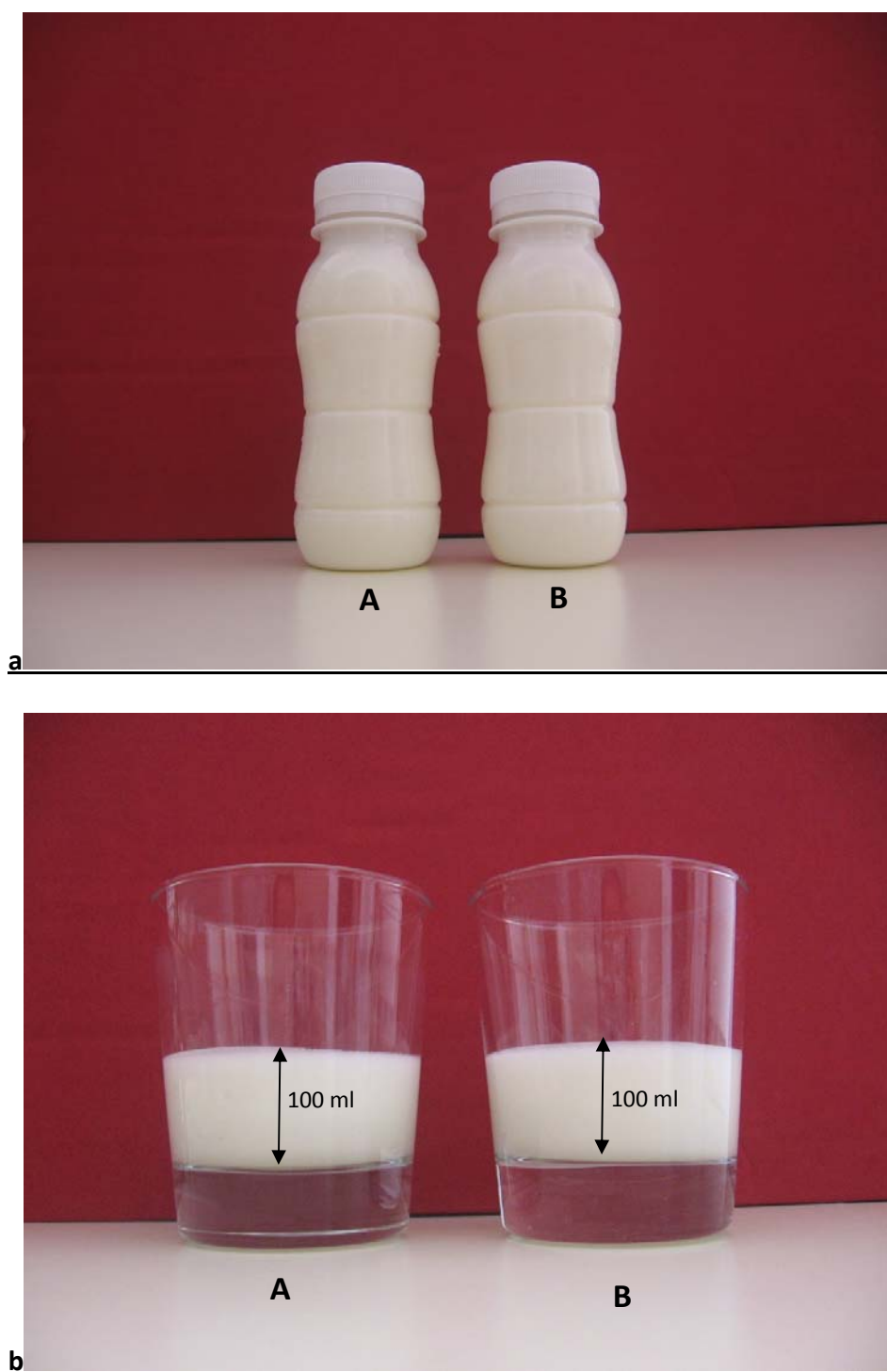
1. **Skupina A** - primili su LGG u količini od 10^9 CFU po dozi u fermentiranom mliječnom pripravku
2. **Skupina B** - primili su placebo – postpasterizirani fermentirani mliječni pripravak sličnog okusa kao što je aktivni proizvod

4.2. Ispitivani pripravci

1. Aktivni pripravak (probiotik): *Lactobacillus rhamnosus GG* u dozi od 10^9 CFU u 100 ml fermentiranog mliječnog pripravka. LGG je soj finske tvrtke Valio, koji je zaštićen pod brojem ATCC 53103.
2. Placebo: 100 ml fermentiranog mliječnog pripravka bez LGG-a.

Oba pripravka donirala je tvrtka Dukat d.o.o., a bili su pakirani u jednake bočice, iste količine, mase, boje i sličnog okusa, sadržaja nepoznatog istraživačima.

Napominje se da je sadržaj pripravka otkriven tek nakon kompletne obrade podataka.



Slika 2. Ispitivani pripravci: a) u jednakom pakiranju b) oba sadrže 100 ml fermentiranog mliječnog pripravka, jedan s LGG-om, a drugi bez.

4.3. Plan istraživanja i istraživačke metode

Ispitivanje je prospektivna, randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana studija.

Randomizacija je provedena upotrebljavajući randomizacijske tablice koje sadrže kompjutorom generirane brojeve. Svakom se ispitaniku/ispitanici dodijelio broj na temelju kojeg su potom uključeni u jednu od skupina (A ili B). U Klinici za dječje bolesti Zagreb istraživanje je trajalo 6 mjeseci (od 19. studenog 2007. godine do 23. svibnja 2008. godine), a djeca su uzimala pripravak za vrijeme boravka u bolnici. Intervencijsko razdoblje za djecu u vrtiću bilo je 3 mjeseca (od 19. studenog 2007. godine do 20. veljače 2008. godine) i djeca su uzimala pripravak svaki dan kroz tri mjeseca. Ispitanici su pripravak uzimali svaki dan u otprilike isto vrijeme i pod nadzorom; u bolnici pod nadzorom liječnika, a u vrtiću pod nadzorom odgajatelja ili roditelja.

Tijekom intervencijskog razdoblja djeca nisu smjela uzimati niti jedan drugi pripravak koji sadrži probiotik ili prebiotik.

Svako dijete je imalo dnevnik (u prilogu) u kojem je liječnik upisivao sve podatke o djetetu: ime i prezime, dob, datum uključanja u studiju, antropometrijske mjere (visina i tjelesna masa), za hospitaliziranu djecu razlog hospitalizacije, zatim evidencija o uzimanju pripravka, podaci o svim simptomima i znakovima tijekom intervencijskog razdoblja te podaci o eventualnim neželjenim štetnim događajima.

Kako bi se smanjio broj ispitanika koji odustaju od istraživanja, ispitivači su kontaktirali telefonom roditelje djece u vrtiću jednom tjedno, a roditelje hospitalizirane djece tjedan dana nakon otpusta. Osim toga, svi liječnici primarne zdravstvene zaštite djece u vrtiću obaviješteni su pismenim putem o istraživanju te su zamoljeni da o svakoj infekciji, na ispričnici za svako dijete napišu točnu dijagnozu, liječenje i eventualno uzročnika infekcije, ako je poznat.

Kako bi se osigurao vremenski period s najvećom incidencijom infekcija istraživanje je provedeno tijekom zimskih mjeseci za djecu u vrtiću te tijekom zimskih i proljetnih mjeseci za hospitaliziranu djecu.

Tek nakon provedenog istraživanja te obrade podataka i dobivanja konačnih rezultata na zajedničkom sastanku istraživača, predstavnika Dukata d.o.o i nezavisnih svjedoka (u rujnu 2008. godine) otkrivene su skupine kojima je utvrđeno da je skupina A ona koja je uzimala LGG, a skupina B placebo.

4.4. Parametri ishoda

Za djecu u bolnici, tijekom hospitalizacije, bilježene su sve nozokomijalne gastrointestinalne i respiratorne infekcije. Nozokomijalne infekcije, kao što je već navedeno, definiraju se kao infekcije koje se javljaju u bolesnika za vrijeme boravka u bolnici (48 sati od primitka u bolnicu), a koje kod prijema nisu bile u fazi inkubacije ili

koje se razvijaju nakon boravka u bolnici, ali je obzirom na duljinu trajanja inkubacije, infekcija nastala u bolnici (186).

Sve infekcije na odjelu bilježio je liječnik, i unesene su uz popratnu dokumentaciju vezanu uz svako dijete. Infekcije su unesene sukladno primarnim i sekundarnim ishodima.

Za djecu u dječjem vrtiću dijagnozu gastrointestinalnih i respiratornih infekcija postavio je njihov liječnik primarne zdravstvene zaštite, specijalist pedijatar. Podaci o infekcijama prikupljeni su iz medicinske dokumentacije primarnog pedijatra te od roditelja svakog djeteta. Ubrojene su se sve gastrointestinalne i respiratorne infekcije nastale za vrijeme intervencijskog razdoblja i one infekcije nakon intervencijskog razdoblja za koje se na temelju inkubacijskog razdoblja može zaključiti da su nastale za vrijeme intervencije.

4.4.1. Primarni parametri ishoda

Primarne parametre ishoda koristili smo kako bi utvrdili postoji li razlika u broju gastrointestinalnih i respiratornih infekcija između djece koja su uzimala LGG i one koja su uzimala placebo.

Oni se odnose na slijedeće:

1. Broj gastrointestinalnih infekcija praćenih proljevom i/ili povraćanjem. Proljev se definira kao 3 ili više vodenih i rjeđih stolica u 24 sata, a kod mlađe djece koja i inače imaju 3 ili više stolica na dan, povećanje broja stolica za 50%.
2. Broj infekcija gornjih dišnih putova, koje uključuju običnu prehladu, faringitis i otitis. Infekcije dijagnosticira liječnik na temelju kliničke slike (simptoma i nalaza u somatskom statusu).
3. Broj infekcija donjih dišnih putova koje uključuju bronhitis, bronhiolitis i pneumoniju. Liječnik postavlja dijagnozu bronhitisa i bronhiolitisa na temelju kliničke slike (simptoma i nalaza u somatskom statusu), a kod hospitalizirane djece učinila se i dodatna obrada koja uključuje laboratorijske nalaze (KKS, CRP) te eventualno RTG pluća, ako je to liječnik smatrao nužnim. Dijagnozu pneumonije također je postavio liječnik na temelju kliničke slike (simptoma i nalaza u somatskom statusu), laboratorijskih nalaza (KKS, CRP) i RTG-a pluća.

4.4.2. Sekundarni parametri ishoda

Sekundarne pametre ishoda koristili smo kako bi utvrdili postoje li razlike u težini gastrointestinalnih i respiratornih infekcija, postoji li razlika u odsustvu iz vrtića i duljini hospitalizacije između djece koja su uzimala LGG i one koja su uzimala placebo.

Oni se odnose na slijedeće:

1. Za gastrointestinalne infekcije odredili smo težinu infekcije i to na slijedeći način: kod djece u vrtiću odredili smo broj infekcija zatim broj povraćanja, broj proljevastih stolica i trajanje infekcije, a kod djece u bolnici upotrijebili smo Vesikarijevu ljestvicu (200). Navedena ljestvica rabi, u procjeni težine gastrointestinalne infekcije u djece, slijedeće parametre: duljinu trajanja infekcije, najveći broj stolica u 24 sata, trajanje povraćanja, najveći broj povraćanja u 24 sata, tjelesnu temperaturu, dehidraciju, liječenje (tablica 4). Infekcija se smatra blagom ako je ukupni zbroj bodova <7 , umjerenom ako je zbroj bodova od 7 do 10 i teškom ako je ≥ 11 bodova.
2. Za respiratorne infekcije u procjeni težine infekcije koristili smo vizualno-analognu skalu (VAS) koju je ispunjavao liječnik. Skala je bodovana od 0 cm (bez bolesti) do 10 cm (najteža infekcija). Nakon što se označi težina infekcije na skali, izmjeri se duljina u centimetrima te se taj broj koristiti u procjeni težine respiratorne infekcije. Osim toga odredili smo i trajanje infekcije u danima te potrebu za uporabom antibiotika.
3. Isto tako, za djecu u vrtiću promatrali smo postoji li razlika u ukupnom broju dana izostalih iz vrtića te broju dana izostalih zbog gastrointestinalnih i respiratornih infekcija, u djece koja su uzimala LGG i one koja nisu.
4. Za djecu u bolnici promatrali smo postoji li razlika u ukupnom trajanju hospitalizacije u djece koja su uzimala LGG i one koja nisu.

Tablica 4. Vesikarijeva ljestvica za određivanje težine gastrointestinalne infekcije (200).

	Bodovi		
	1	2	3
Duljina trajanja infekcije/dani	1-4	5	≥6
Najveći broj stolica u 24 sata	1-3	4-5	≥6
Trajanje povraćanja/dani	1	2	≥3
Najveći broj povraćanja u 24 sata	1	2-4	≥5
Tjelesna temperatura	37,1-38,4	38,5-38,9	≥39,0
Dehidracija	-	Blaga	Umjerena do jaka
Liječenje	Rehidracija	Hospitalizacija	-

4.5. Statističke metode

Rabljena je deskriptivna statistika s obzirom na dob, spol, trajanje intervencija i simptome bolesti. Primjenom Smirnov-Kolmogorovljevog testa analizirana je distribucija podataka.

Razlike u distribuciji kvalitativnih varijabli utvrđene su χ^2 testom, dok su se za razlike kvantitativnih varijabli, s obzirom na distribuciju, koristili parametrijski t-test ili neparametrijski Mann-Whitneyev test. Binarnom logističkom regresijom odredili smo značajne prediktore gastrointestinalnih i respiratornih infekcija. Regresijski model uključio je za bolničke infekcije: dob, spol, trajanje hospitalizacije te promatrane grupe kao prediktore gastrointestinalnih i respiratornih infekcija. Za infekcije u kolektivnu model je uključivao: dob, spol i promatrane grupe. Sve statističke analize su dvosmjerne, a razina značajnosti od 5% smatrala se značajnom. Za statističke analize koristili smo statistički *software* SPSS (verzija 15.1; SPSS, Chicago). StatsDirect (version 2.5.6. [2006-04-15]; Iain E. Buchan) koristili smo za izračunavanje relativnog rizika (RR), 95% interval pouzdanosti (CI) i broj bolesnika kojih je potrebno liječiti da bi se spriječio neželjeni učinak kod jednog (number needed to treat (NNT)). Razlika između istraživanih grupa smatra se značajnom kada je p vrijednost bila $<0,05$ ili je 95% CI za RR nije bio veći od 1,0 (ekvivalent $p < 0,05$). Sve su analize rađene kao analiza namjere liječenja (*intention-to-treat*), u kojoj su analizirani svi ispitanici koji su sudjelovali u

liječenje i to prema intervenciji koju su primili (LGG ili placebo), neovisno o tome jesu li je uopće primili ili ne.

Za hospitaliziranu djecu učinjena je i podanaliza po dobnim skupinama: 1-5, 5-10, 10-15, 15-18 godina.

4.6. Određivanje veličine uzorka

4.6.1. Istraživanje na Klinici za pedijatriju

Predpostavili smo da je razlika između ispitivane i kontrolne skupine 15%, s parametrima $\alpha=0,05$, $\beta=0,10$ (snaga testa, *power*=0,90). Broj kontrola prema ispitaniku je 1. Prema navedenim podacima, minimalni uzorak za Fisher exact dvosmjerni test je 484 ispitanika (242 ispitanika po skupini) (*GPower, version 3.0.9*).

Ispitivanjem je uključeno 742 djece, što je za 35% više od potrebnog uzorka.

4.6.2. Istraživanje u vrtiću

Prema dosadašnjim istraživanjima predpostavili smo da je razlika između ispitivane i kontrolne skupine 20%, s parametrima $\alpha=0,05$, $\beta=0,10$ (snaga testa, *power*=0,90). Broj kontrola prema ispitaniku je 1. Prema navedenim podacima, minimalni uzorak za Fisher

exact dvosmjerni test je 266 ispitanika (133 ispitanika po skupini) (*GPower, version 3.0.9*).

Uključeno je 281 dijete, što je za 5% više od potrebnog uzorka.

4.7. Odobrenja

4.7.1. Etička povjerenstva

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb i Gradski ured za obrazovanje, kulturu i sport Grada Zagreba. Da bi dijete sudjelovalo u istraživanju, barem jedan od roditelja ili zakonskih skrbnika, trebao je potpisati informirani pristanak.

Informirani pristanak je u prilogu.

4.7.2. Dodatna odobrenja

1. Između istraživača i Dukata d.d. sklopljen je ugovor u kojem je istaknuto da Dukat donira fermentirane mliječne pripravke (probiotik i placebo) i jamči za

njihovu ispravnost te vijabilnost probiotika, a istraživači doniraju rad - i jedni i drugi bez bilo kakve financijske naknade.

2. Proizvođač probiotika LGG, Valio Ltd. (Helsinki, Finska), odobrio je korištenje njihovog soja LGG (ATCC 53103) u istraživanju.
3. Protokol istraživanja revidirala je prof.dr.sc. Hania Szajewska, jedna od vodećih stručnjakinja na području probiotika u Europi.
4. Istraživanje je prijavljeno u međunarodni registar za randomizirane kontrolirane studije (International Standard Randomized Controlled Trial Number Register - ISRCTN registar) pod slijedećim brojevima:
 - *Lactobacillus GG* u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece - ISRCTN18761855
 - *Lactobacillus GG* u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece u kolektivu - ISRCTN16959643.

5. REZULTATI

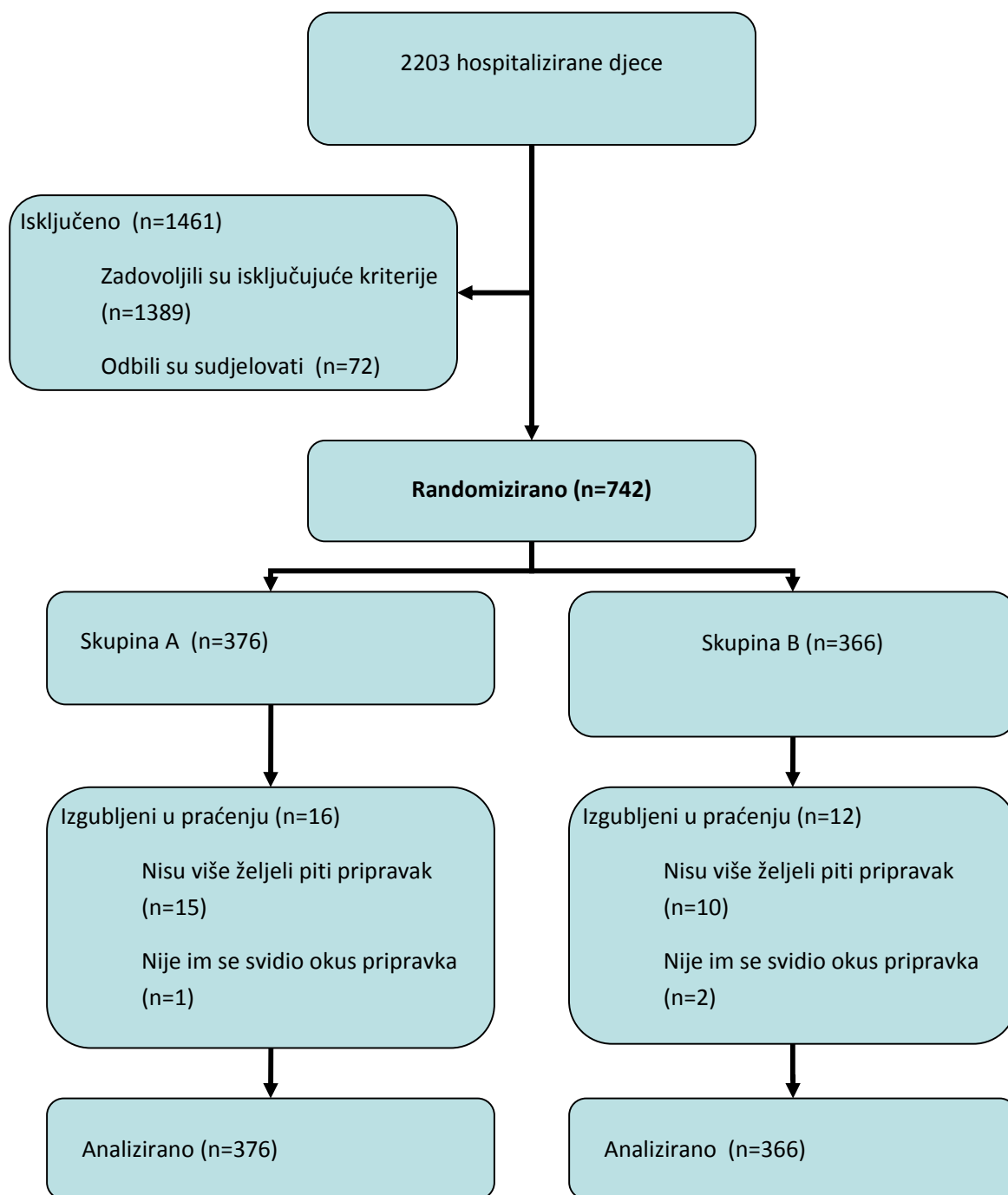
Budući da je riječ o istraživanju o preventivnoj ulozi probiotika u dvije odvojene indikacije, u hospitalizirane djece i djece u kolektivu, te budući da se podaci ne mogu uspoređivati, rezultate ćemo pokazati odvojeno.

5.1. Rezultati – Uloga LGG u prevenciji nozokomijalnih infekcija

5.1.1. Ispitanici

Od svih bolesnika koji su mogli biti uključeni u studiju (n=2203), randomizirano je 742 djece (34%). 1389 (63%) bolesnika nije uključeno jer je zadovoljavao jedan od isključujućih kriterija, a svega 72 (3%) djece nije željelo sudjelovati u istraživanju (slika 3).

Od 742 djece koja su uključena u istraživanje 376 je bilo randomizirano u skupinu A (skupina koja je primala LGG), a 366 u skupnu B (skupina koja je primala placebo).



Slika 3. Dijagram istraživanja prema CONSORT pravilima (201).

Između grupa nije bilo statistički značajne razlike obzirom na spol djece, dob, te razloge hospitalizacije (tablica 5).

Srednja vrijednost dobi za djecu u skupini A bila je 9,9 godina, a u skupini B iznosila je 10,6 godina ($p=0,187$). U skupini A bilo je 185 (49,2%) djevojčica i 191 (50,8%) dječak, a u skupini B, 162 (44,3%) djevojčice i 204 (55,7%) dječaka ($p=0,087$). Raspodjela po odjelima prikazana je u tablica 5.

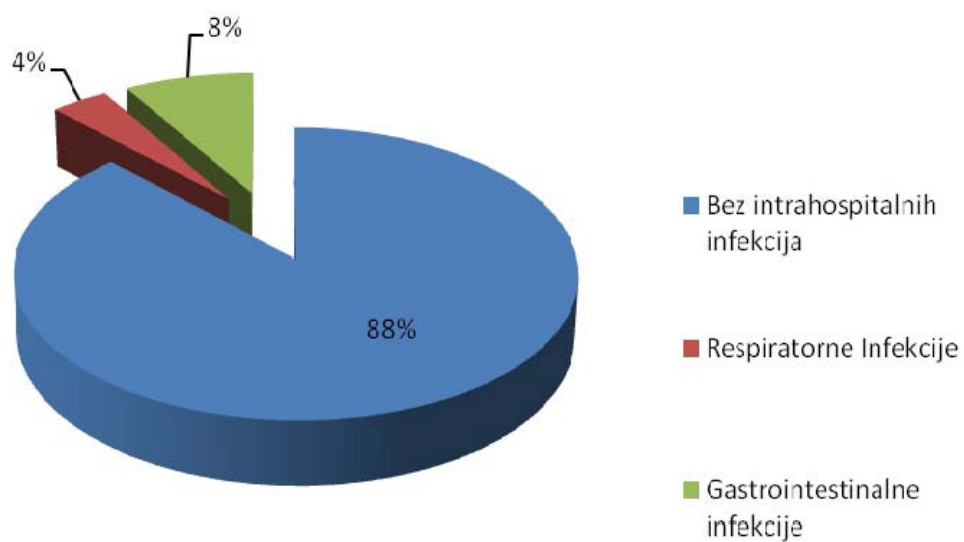
Tablica 5. Razlike između ispitivanih skupina: hi-kvadrat test

Variable	Skupina A (N=376)	Skupina B (N=366)	P vrijednost
Dob ¹ (godine)	9,9 ± 5,1	10,6 ± 5,0	0,187
Ženski spol	185 (49,2%)	162 (44,3%)	0,087
Neinfektivne gastrointestinalne bolesti	60 (16,0%)	49 (13,4%)	0,370
Genetski poremećaji	34 (9,0%)	44 (12,0%)	0,209
Kardiovaskularne bolesti	36 (9,6%)	29 (7,9%)	0,490
Bolesti mokraćnog sustava	21 (5,6%)	21 (5,7%)	0,920
Neurološke bolesti	125 (33,2%)	132 (36,1%)	0,567
Neinfektivne pulmoalergološke bolesti	73 (19,4%)	70 (19,1%)	0,991
Trovanja	27 (7,2%)	21 (5,7%)	0,495

¹ Srednja vrijednost ± SD; razlika analizirana Student t testom

5.1.2. Ukupan broj nozokomijalnih infekcija

Od ukupnog broja bolesnika u istraživanju (n=742) kod njih 91 (12%) zabilježene su nozokomijalne infekcije - kod 63 bolesnika gastrointestinalne, a kod 28 bolesnika respiratorne intrahospitalne infekcije (slika 4).



Slika 4. Prikaz ukupnog broja intrahospitalnih infekcija u ispitanika.

5.1.3. Rezultati primarnih ishoda

Broj gastrointestinalnih infekcija bio je značajno niži u skupini koja je uzimala LGG (skupina A) u odnosu na skupinu koja je uzimala placebo (skupina B). U skupini A je 19 djece (5,1%), a u skupini B je 44 djece (12,0%) imalo gastrointestinalnu infekciju (RR 0,4; 95% CI 0,25 do 0,7, $p < 0,001$). Drugim riječima, djeca koja su uzimala probiotik imala su za 60% niži relativni rizik razvijanja nozokomijalnih gastrointestinalnih infekcija u usporedbi s djecom na placebo. Sukladno navedenim rezultatima bilo bi potrebno da 15 djece uzima LGG kako bi se spriječila jedna gastrointestinalna infekcija (NNT 15; 95% CI 9 do 34).

Slično tome, rizik od respiratornih infekcija bio je značajno niži, čak za 62%, u skupini koja je uzimala LGG. U skupini A je 8 djece imalo respiratornu infekciju (2,1%), u odnosu na 20 (5,5%) djece u skupini B (RR 0,38; 95% CI 0,18 do 0,85; $p = 0,017$). Što se tiče respiratornih infekcija, NNT je bio nešto viši, odnosno iznosio je 30 (NNT 30; 95% CI 16 do 159) (tablica 6).

Tablica 6. Rezultati primarnih ishoda i razlike između ispitivanih skupina: hi-kvadrat test.

Varijabla	Skupina A (N=376)	Skupina B (N=366)	P	RR (95% CI)	NNT (95% CI)
Gastrointestinalne infekcije	19 (5,1%)	44 (12,0%)	<0,001	0,4 (0,25- 0,7)	15 (9- 34)
Respiratorne infekcije	8 (2,1%)	20 (5,5%)	0,017	0,38 (0,18-0,85)	30 (16-159)

5.1.4. Rezultati sekundarnih ishoda – gastrointestinalne infekcije

5.1.4.1. Broj epizoda povraćanja i proljeva

U usporedbi s placebo skupinom, djeca koja su uzimala LGG imala su značajno manje epizoda povraćanja i značajno manje epizoda proljeva (RR 0,5; 95% CI 0,3 do 0,9; $p=0,015$; RR 0,24; 95% CI 0,1 do 0,5; $p<0,001$, redom) (tablica 7).

Tablica 7. Rezultati sekundarnih ishoda i razlike između grupa: hi-kvadrat test.

Varijable	Skupina A (N=376)	Skupina B (N=366)	P vrijednost	RR (95% CI)	NNT (95% CI)
Epizode povraćanja	17 (4,5%)	33 (9,0%)	0,015	0,5 (0,3 - 0,9)	23 (13 - 110)
Epizode proljeva	7 (1,9%)	28 (7,7%)	<0,001	0,24 (0,1 - 0,5)	18 (11 - 35)

5.1.4.2. Težina infekcije

Ocjena težine gastrointestinalne infekcije Vesikarijevom ljestvicom pokazala je da je u skupini A bilo 6 djece s blagom, 10 djece s umjerenom i 3 djece s teškom infekcijom, dok je u skupini B bilo 14 djece s blagom, 24 s umjerenom i 6 s teškom infekcijom (tablica 8). Nađena je statistički značajna razlika u težini infekcija između skupina ($p=0,01$) (tablica 9).

Tablica 8. Težina infekcije ocjenjena Vesikarijevom ljestvicom u obje skupine

Težina infekcije	Skupina A (N=19)	Skupina B (N=44)
<7 blaga	6	14
7 do 10 umjerenom	10	24
≥11 teška	3	6

Tablica 9. Ukupni broj bodova Vesikarijeve ljestvice za obje skupine: Student *t* test.

Težina GI infekcije	Skupina A (N=19)	Skupina B (N=44)	P vrijednost
Raspon	5-11	5-17	0,01
Srednja vrijednost	7	8.2	

5.1.4.3. Uzroci gastrointestinalnih infekcija

Nitko od bolesnika nije imao bakterijsku infekciju. U pet bolesnika dokazan uzročnik u stolici: rotavirus u dva ispitanika (oba u skupini B), norovirus u tri bolesnika (dva u skupini B, jedan u skupini A). Svi su bolesnici liječeni simptomatski, nitko nije zahtijevao antibiotsko liječenje.

5.1.5. Rezultati sekundarnih ishoda – respiratorne infekcije

5.1.5.1. Vrste respiratornih infekcija

Kod velike većine bolesnika s nozokomijalnim infekcijama dijagnosticirane su infekcije gornjih dišnih puteva, štoviše, samo u jednog bolesnika (u skupini B) dijagnosticirana je pneumonija (tablica 10).

Bakterijski uzročnik dokazan je samo u 5 bolesnika koji su stoga liječeni antibioticima, od tih bolesnika 4 je bilo iz skupine B.

Tablica 10. Tipovi respiratornih infekcija, razlike između skupina.

Dijagnoza	Skupina A	Skupina B
Obična prehlada	5	8
Faringitis	3	8
Otitis media	0	3
Pneumonija	0	1

5.1.5.2. Težina i trajanje respiratornih infekcija

Što se tiče procjene težine respiratorne infekcije, upotrebljavajući VAS nije nađena značajna razlika između grupa obzirom na težinu respiratorne infekcije. Prosječna težina respiratorne infekcije ocijenjena je kao 3,45 (medijan 3) u skupini B i 2,75

(medijan 2) u skupini A ($p=0,077$). Isto tako nije nađena značajna razlika u duljini trajanja simptoma. Simptomi respiratorne infekcije u skupini A trajali su prosječno 3,13 dana (medijan 3), a u skupini B, 4 dana (medijan 4) ($p=0,23$) (tablica 11).

Tablica 11. Trajanje infekcije i težina respiratornih simptoma: hi-kvadrat test.

Variable	Skupina A (N=376)	Skupina B (N=366)	P vrijednost
Trajanje respiratorne infekcije ¹	3,13 (3)	4 (4)	0,23
Težina respiratorne infekcije ¹	2,75 (2)	3,45 (3)	0,078

¹ srednja vrijednost (medijan);

5.1.6. Trajanje hospitalizacije

Osim navedenog, određivala se i ukupna duljina trajanja hospitalizacije koja je za skupinu A iznosila 5 dana, a za skupinu B iznosila je 4 dana. Navedena razlika nije se pokazala statistički značajnom ($p=0,109$) (tablica 12).

Tablica 12. Duljina trajanja hospitalizacije: Mann-Whitney U test.

Varijabla	Skupina A (N=376)	Skupina B (N=366)	P vrijednost
Trajanje hospitalizacije (dani) ¹	5 (3 - 7)	4 (4 - 6)	0,109

¹ medijan (raspon);

5.1.7. Izračunavanje prediktivnih čimbenika – gastrointestinalne infekcije

Ispitanici koji su primili placebo imali su 2,89 puta veću vjerojatnost za razvoj gastrointestinalne infekcije (OR=2,89, CI 1,63-5,15; tablica 13) u odnosu na bolesnike koji su uzimali LGG. Isto tako, trajanje hospitalizacije povećava vjerojatnost od razvoja infekcije za 9% svaki dan nakon trećeg dana boravka u bolnici (OR= 1,09, CI 1,04-1,15). Niti spol niti dob nisu se pokazali značajnima u predviđanju vjerojatnosti od razvoja gastrointestinalne infekcije.

Tablica 13. Prediktori gastrointestinalnih infekcija: binarna logistička regresija.

Prediktor	OR (95% CI)	P vrijednost
Skupina B	2,89 (1,63 – 5,15)	<0,001
Trajanje hospitalizacije (intervencije)	1,09 (1,04 – 1,15)	0,001
Ženski spol	1,32 (0,77 – 2,25)	0,303
Mlađa dob	1,04 (0,95 – 1,08)	0,124

5.1.8. Izračunavanje prediktivnih faktora – respiratorne infekcije

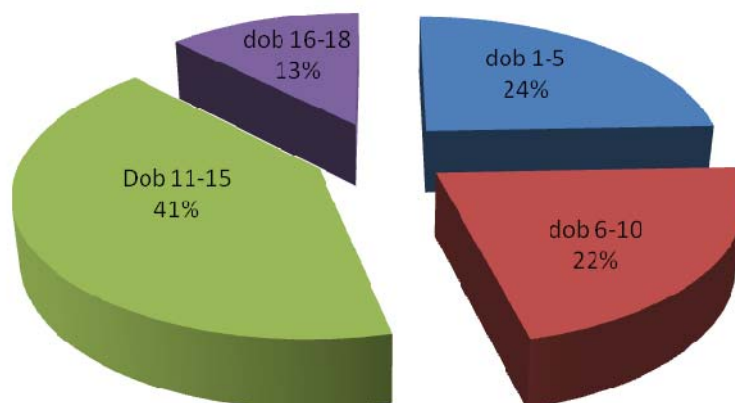
Bolesnici koji su primili placebo imali su 3,17 puta veću vjerojatnost od razvoja respiratorne infekcije u odnosu na bolesnike koji su primili LGG (OR=3,17, CI 1,35-7,43, tablica 14); rizik su povećavali slijedeći parametri: a) duljina trajanja hospitalizacije, 6% za svaki dan nakon trećeg dana boravka u bolnici (OR= 1,06, CI 1,01-1,12), b) mlađa dob - 12% za svako smanjenje godina (OR= 1,12, CI 1,04-1,21) i c) ženski spol (OR= 2,52, CI 1,11-5,69).

Tablica 14. Prediktori respiratornih infekcija: binarna logistička regresija.

Prediktor	OR (95% CI)	P vrijednost
Skupina B	3,17 (1,35 – 7,43)	0,008
Trajanje hospitalizacije (intervencije)	1,06 (1,01 – 1,12)	0,033
Ženski spol	2,52 (1,11 – 5,69)	0,026
Mlađa dob	1,12 (1,04 – 1,21)	0,003

5.1.9. Podanaliza po dobnim skupinama

Učinjena je i podanaliza po dobnim skupinama. Od ukupnog broja djece, raspodjela po dobi bila je slijedeća: najviše djece bilo je u dobi od 11-15 godina (41%), zatim u skupini od 1-5 godina (24%), u skupini 6-10 godina (22%) i skupini 16-18 godina (13%) (slika 5).



Slika 5. Prikaz raspodjele bolesnika po dobnim skupinama.

5.1.9.1. Dobna skupina 1-5 godina

U skupini najmlađe djece (1-5 godina) sudjelovalo je ukupno 181 dijete, od čega je 92 bilo u skupini A, a 89 u skupini B.

Od ukupnog broja infekcija u ovoj skupini zabilježeno je 13 respiratornih i 19 gastrointestinalnih infekcija. Od toga u skupini A bilo je 5, a u skupini B 8 respiratornih infekcija, što nije statistički značajno ($p=0,26$).

Suprotno tome, značajna razlika nađena je u broju gastrointestinalnih infekcija, u skupini A bile su 3 infekcije, a u skupini B njih 16 ($p<0,001$) (tablica 15).

Tablica 15. Broj infekcija u dobnoj skupini od 1-5 godina: Student *t* test.

	Skupina A	Skupina B	
	(N=92)	(N=89)	P st
Broj respiratornih infekcija	5	8	0,88
Broj gastrointestinalni infekcija	3	16	<0,001

5.1.9.2. Dobna skupina 6-10 godina

U dobnoj skupini 6-10 godina sudjelovalo je 162 djece, 82 u skupini A i 80 u skupini B.

Od ukupnog broja infekcija u ovoj skupini zabilježeno je 6 respiratornih i 19 gastrointestinalnih infekcija. Iako je u skupini B bilo više i respiratornih (5 prema 1) i gastrointestinalnih infekcija (12 prema 7) razlika nije bila statistički značajna (tablica 16).

Tablica 16. Broj infekcija u dobnoj skupini od 6-10 godina: Student *t* test.

	Skupina A	Skupina B	
	(N=82)	(N=80)	P vrijednost
Broj respiratornih infekcija	1	5	0,09
Broj gastrointestinalni infekcija	7	12	0,20

5.1.9.3. Dobna skupina 11-15 godina

U najvećoj skupini djece, dobna skupina 11-15 godina sudjelovalo je ukupno 307 djece, od čega je 156 bilo u skupini A, a 151 u skupini B.

Od ukupnog broja infekcija u ovoj skupini zabilježeno je 6 respiratornih i 19 gastrointestinalnih infekcija. Iako je u skupini B bilo više i respiratornih (5 prema 1) i gastrointestinalnih infekcija (11 prema 8) razlika nije bila statistički značajna (tablica 17).

Tablica 17. Broj infekcija u dobnoj skupini od 11-15 godina: Student *t* test.

	Skupina A	Skupina B	
	(N=156)	(N=151)	P vrijednost
Broj respiratornih infekcija	1	5	0,09
Broj gastrointestinalni infekcija	8	11	0,43

5.1.9.4. Dobna skupina 16-18 godina

U najstarijoj skupini djece, dobna skupina 16-18 godina sudjelovalo je ukupno 92 djece, od čega je 46 bilo u skupini A i 46 u skupini B.

Od ukupnog broja infekcija u ovoj skupini zabilježene su samo 3 respiratorne i 6 gastrointestinalnih infekcija. Iako je u skupini B bilo više i respiratornih (2 prema 1) i gastrointestinalnih infekcija (5 prema 1) razlika nije bila statistički značajna (tablica 18).

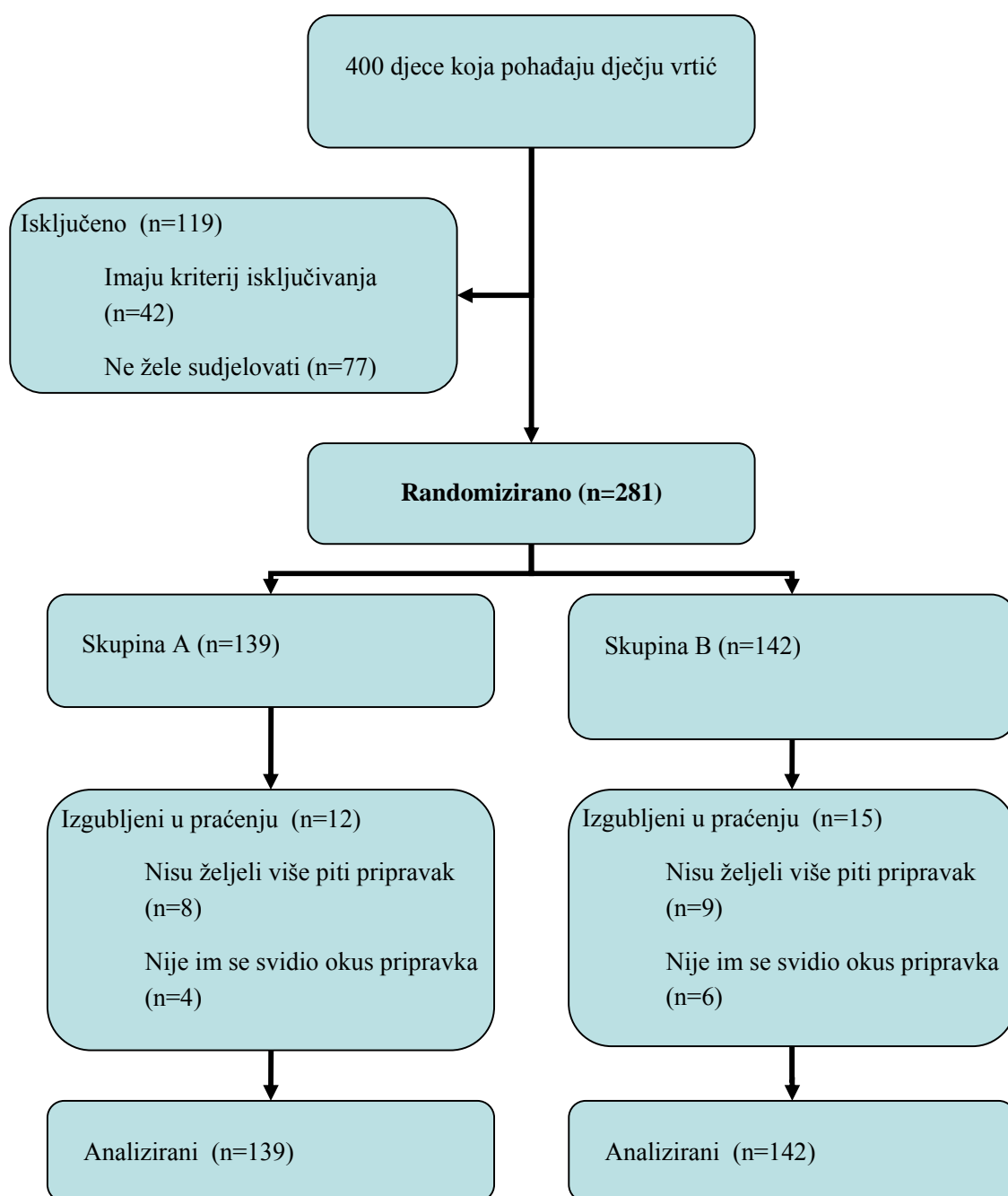
Tablica 18. Broj infekcija u dobnoj skupini od 16-18 godina: Student *t* test.

	Skupina A	Supina B	
	(N=46)	(N=46)	P vrijednost
Broj respiratornih infekcija	1	2	0,56
Broj gastrointestinalni infekcija	1	5	0,09

5.2. Rezultati – Uloga LGG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece u kolektivu

5.2.1. Ispitanici

Od sve djece (N=400) koja su mogla biti uključena u studiju (polaznici dječjeg vrtića Matija Gubec) u studiju ih je uključeno 281. Od ostale djece, 42 je imalo neki od isključujućih kriterija, a 77 nije željelo sudjelovati u istraživanju. Nakon provedene randomizacije 139 djece je randomizirano u skupinu A i oni su primali pripravak s LGG-om, a 142 je randomizirano u skupinu B i oni su uzimali placebo (slika 6).



Slika 6. Dijagram istraživanja prema CONSORT pravilima (201).

Nije nađena statistički značajna razlika u demografskim karakteristikama između skupine A i skupine B: medijan dobi djece iz skupine A bio je 4,3 godine (51,85 mjeseci), a skupine B 4,45 godina (53,56 mjeseci) ($p=0,445$). U skupini A bila je 61 djevojčica (43,9%) i 78 dječaka (56,1%), a u skupini B bile su 63 djevojčice (44,4%) i 79 (55,6%) dječaka ($p=0,935$). Nije zabilježena niti razlika između tjelesne mase i tjelesne visine prije i nakon istraživanja između skupina (0,5 kg i 1,5 cm bila je srednja vrijednost za obje skupine, $p=0,663$, $p=0,89$) (tablica 19).

Tablica 19. Karakteristike ispitivanih skupina: hi-kvadrat test.

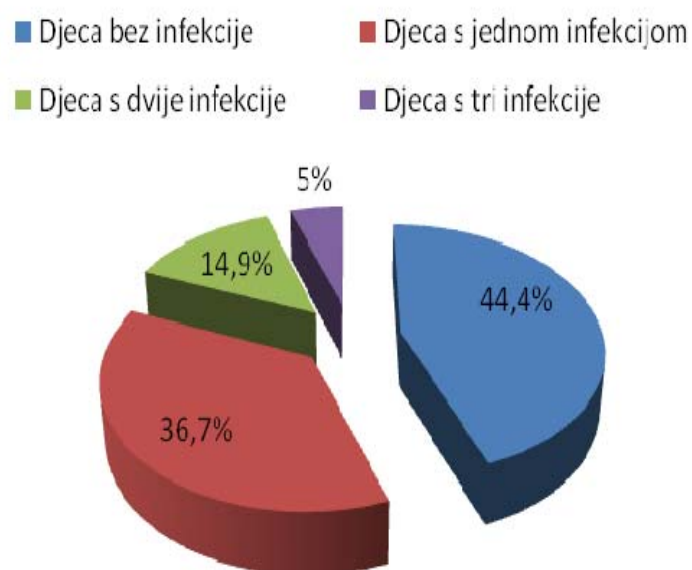
Variable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P vrijednost
Dob ¹ (mjeseci)	51,85	53,56	0,445
Ženski spol, n (%)	61 (43,9%)	63 (44,4%)	0,935
Razlika u TM prije i nakon studije (kg) ²	0,5	0,5	0,663
Razlika u visini prije i nakon studije (cm) ²	1,5	1,5	0,890

¹razlika analizirana student t testom

²medijan; razlika analizirana Mann-Whitney U testom

5.2.1.1. Ukupan broj respiratornih infekcija

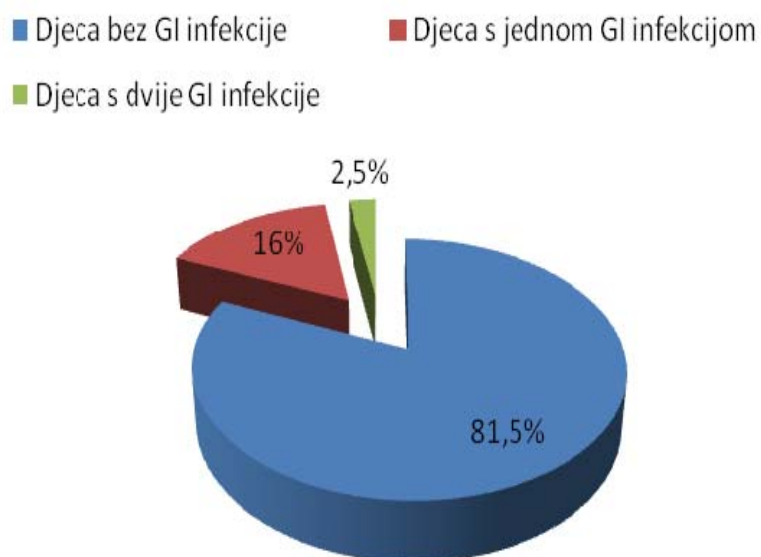
Od ukupnog broja djece koja su sudjelovala u istraživanju (n=281), 103 djece (36,7%) je imalo jednu, 39 (13,9%) dvije, a 14 (5%) tri infekcije (slika 7).



Slika 7. Ukupan broj respiratornih infekcija u svih ispitanika

5.2.1.2. Ukupan broj gastrointestinalnih infekcija

Od ukupnog broja djece koja su sudjelovala u istraživanju ($n=281$), 45 djece (16,01%) je imalo jednu, a 7 (2,5%) dvije gastrointestinalne infekcije (slika 8).



Slika 8. Ukupan broj gastrointestinalnih infekcija u svih ispitanika

5.2.2. Rezultati primarnih ishoda

Broj djece s respiratornim infekcijama bio je značajno niži u skupini A nego u skupini B.

U skupini A je 60 (43,2%) imalo respiratornu infekciju, a u skupini B njih 96 (67,6%) (RR 0,63; 95% CI 0,51 - 0,79; NNT 5; 95% CI 3 – 8; $p < 0,001$) (tablica 20).

Međutim, statistički značajna razlika u broju djece s gastrointestinalnim infekcijama između skupina nije potvrđena. U skupini koja je uzimala LGG je 20 (14,4%) djece imalo gastrointestinalnu infekciju, a u skupini B njih 32 (22,5%) (RR 0,63; 95% CI 0,38 - 1,06; $p = 0,079$) (tablica 20).

Tablica 20. Razlika u primarnim ishodima: hi-kvadrat test.

Varijable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P vrijednost	Relativni rizik (95% CI)	NNT (95% CI)
Broj djece s resp. Infekcijama	60 (43,2%)	96 (67,6%)	<0,001	0,63 (0,51-0,79)	5 (3 – 8)
Broj djece s GI infekcijama	20 (14,4%)	32 (22,5%)	0,079	0,63 (0,38-1,06)	NS ¹

¹NS - nije značajno

5.2.3. Rezultati sekundarnih ishoda – respiratorne infekcije

5.2.3.1. Vrste i broj respiratornih infekcija

Analizom sekundarnih ishoda nađeno je da se oni koji se odnose na respiratorne infekcije također razlikuju između skupina. Značajno je manje ispitanika koji su razvili infekcije gornjih dišnih putova u skupini koja je uzimala LGG (skupina A) u odnosu na one koji su uzimali placebo (skupina B) (RR 0,57; 95% CI 0,41 do 0,78; NNT 5, 95% CI 4 do 11) (tablica 21). Od navedene djece, u B skupini bilo je i značajno više djece koja su imala 2 ili 3 respiratorne infekcije za vrijeme trajanja intervencije ($p=0,005$) (slika 9, tablica 22). Nije nađena statistički značajna razlika u riziku od infekcija donjih dišnih putova između skupina A i B (RR 0,82; 95% CI 0,24 do 2,76) (tablica 21).

Tablica 21. Rezultati sekundarnih ishoda: hi-kvadrat test

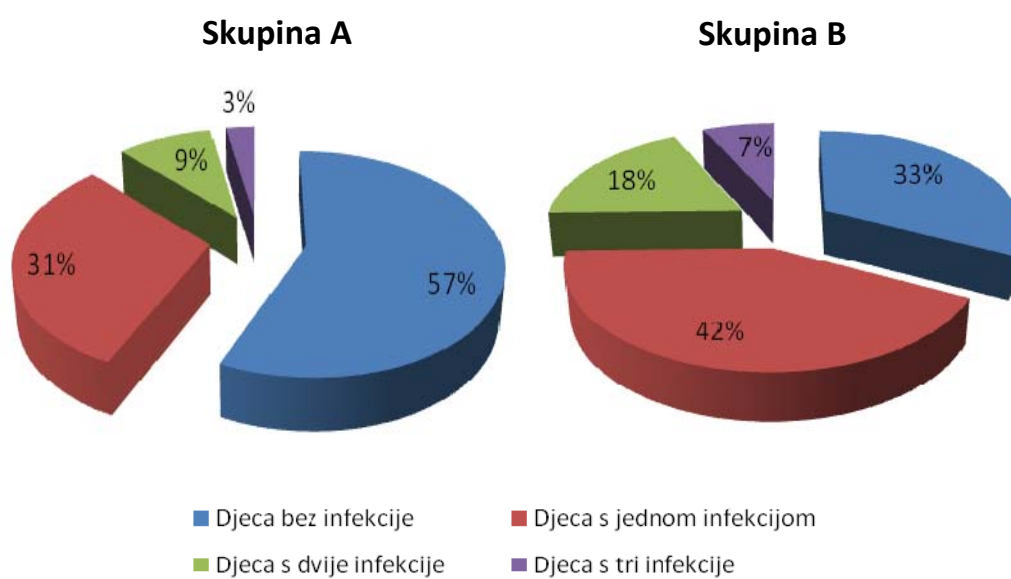
Varijable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P	Relativni rizik (95% CI)	NNT (95% CI)
Broj bolesnika koji su razvili infekcije gornjih dišnih putova	58 (41,7%)	95 (66,9%)	<0,001	0,66 (0,52-0,82)	5 (4 – 10 pomaže)
Broj bolesnika koji su razvili infekcije donjih dišnih putova*	4 (2,9%)	5 (3,5%)	0,759	0,82 (0,24-2,76)	NS ¹

¹NS - nije značajno;

* Broj bolesnika neovisno o tome jesu li imali ranije infekcije gornjih dišnih putova

Tablica 22. Broj djece s jednom, dvije ili tri respiratorne infekcije tijekom intervencije:Student *t* test.

Broj djece s	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P vrijednost
Jednom infekcijom	43	60	0,049
Dvije ili tri infekcije	17	36	0,005

**Slika 9.** Zastupljenost respiratornih infekcija u obje skupine.

Razlike u vrstama respiratornih infekcija prikazane su u tablici 23.

Tablica 23. Dijagnoze respiratornih infekcija: Student *t* test.

Dijagnoza	Skupina B (N=142)	Skupina A (N=139)	P vrijednost
Obična prehlada	66	34	<0,001
Faringitis	52	26	<0,001
Otitis	19	9	0,053
Bronhitis	3	4	0,7
Pneumonija	2	0	0,16

5.2.3.2. Težina respiratornih infekcija

Između skupina nađena je statistički značajna razlika u odnosu na težinu infekcije određenu VAS-om. Medijan vrijednosti težine infekcije u skupini B iznosio je 3, a srednja vrijednost 3,69, dok je u skupini A skupina medijan iznosio 0, a srednja vrijednost 1,81 ($p < 0,001$) (tablica 24).

Jednako tako statistički značajna razlika nađena je i u ukupnoj duljini trajanja respiratornih infekcija. Medijan trajanja infekcije u skupini B bio je 4, a srednja vrijednost 4,31 dan, dok je u skupini A medijan bio 0, a srednja vrijednost je iznosila 3,4 dana ($p<0,001$) (tablica 24).

U skupini B je 34 djece liječeno antibioticima zbog respiratorne infekcije (31 za infekcije gornjih dišnih putova i 3 za infekcije donjih dišnih putova), a u skupini A je 23 djece liječeno antibioticima (19 za infekcije gornjih i 4 za infekcije donjih dišnih putova). Statistička razlika između skupina nije bila statistički značajna ($p=0,12$) (tablica 24).

Tablica 24. Rezultati sekundarnih ishoda: hi-kvadrat test.

Varijable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P vrijednost
Težina infekcije			<0,001
Medijan	0	3	
Srednja vrijednost	1,81	3,69	
Ukupno trajanje respiratornih simptoma (dani) ¹			<0,001
Medijan (raspon)	0 (0-21)	4 (0-22)	
Srednja vrijednost	3,40	4,31	

Liječenje antibioticima	23	34	0,12
-------------------------	----	----	------

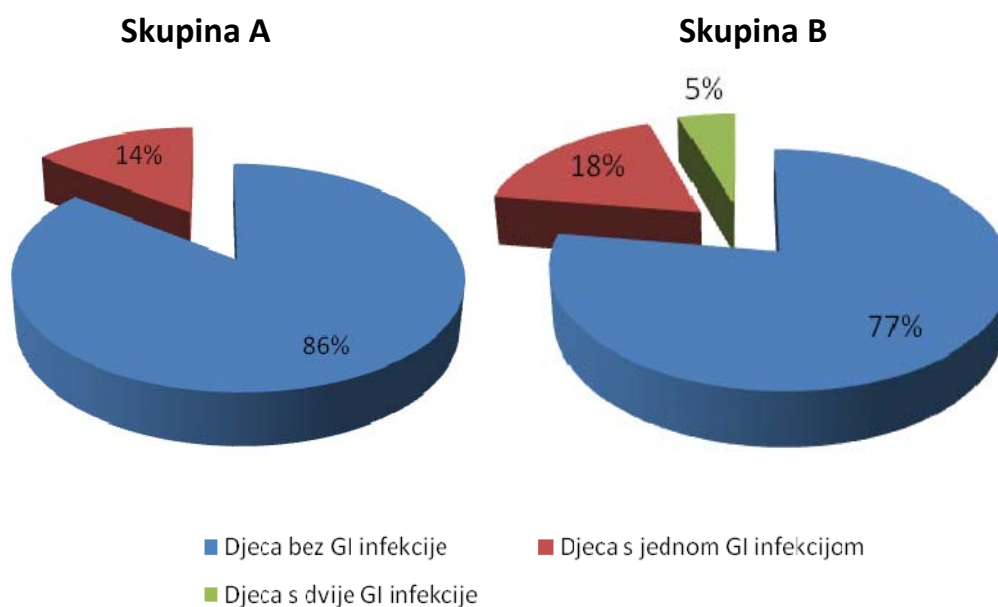
¹ Razlika analizirana Mann-Whitney U testom

5.2.4. Rezultati sekundarnih ishoda – gastrointestinalne infekcije

Premda nije potvrđena preventivna djelotvornost LGG-a u sprječavanju gastrointestinalnih infekcija, nađeno je da njegova uporaba štiti od njihova ponavljanja. Od ukupnog broja djece koja su razvila gastrointestinalne infekcije samo je u skupini B bilo djece koja su za vrijeme intervencijskog razdoblja imala dvije gastrointestinalne infekcije (7 u skupini B prema 0 u skupini A, $p=0,008$) (tablica 25) (slika 10).

Tablica 25. Broj djece s jednom ili dvije gastrointestinalne infekcije u obje ispitivane skupine: Student t test.

	Skupina A (N=20)	Skupina B (N=32)	P vrijednost
Djeca s			
Jednom GI infekcijom	20	25	0,46
Dvije GI infekcije	0	7	0,008



Slika 10. Djeca s jednom ili dvije gastrointestinalne infekcije u obje skupine.

Nije nađena statistički značajna razlika između skupina u odnosu na broj epizoda povraćanja (RR 0,60; 95% CI 0,29 – 1,24; $p=0,174$), niti epizoda proljeva (RR 0,63; 95% CI 0,35 – 1,11; $p=0,110$) (tablica 26). Isto tako, nije nađena razlika u duljini trajanja infekcija između grupa ($p=0,75$) niti u broju infekcija koje su trajale dulje od 2 dana (RR 0,98; 95% CI 0,91 – 1,06; $p=0,639$) (tablica 26).

Niti jedno dijete tijekom intervencije nije razvilo bakterijsku gastrointestinalnu infekciju te stoga nije niti liječeno antibioticima već su svi liječeni simptomatski.

Tablica 26. Rezultati sekundarnih ishoda: hi-kvadrat test.

Varijable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P	RR (95% CI)	NNT (95% CI)
Epizode povraćanja	10 (7,2%)	17 (12,0%)	0,174	0,60 (0,29-1,24)	NS ¹
Epizode proljeva	16 (11,5%)	26 (18,3%)	0,110	0,63 (0,35-1,11)	NS ¹
Broj GI infekcija koje su trajale dulje od 2 dana	14 (10,1%)	12 (8,5%)	0,639	0,98 (0,91-1,06)	NS ¹
Trajanje GI infekcije			0,75		
Medijan	0	0			
(raspon)	(0-7)	(0-11)			
Srednja vrijednost	0,75	0,49			

¹NS - nije značajno

5.2.5. Rezultati sekundarnih ishoda – izostanak iz vrtića

Iako nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom izostajanju iz vrtića ($p=0,07$), djeca koja su uzimala LGG su značajno manje izostajala iz vrtića zbog respiratornih i gastrointestinalnih infekcija (tablica 27).

Tablica 27. Rezultati sekundarnih ishoda: chi-square test.

Variable	Skupina A (N=139)	Skupina B (N=142)	P vrijednost
Izostanak iz vrtića (dani) ¹	19,6 (0 – 30,0)	21,4 (0 – 32,0)	0,070
Izostanak iz vrtića zbog infekcije (dani) ¹	3,05 (0 – 21,0)	5,12 (0 – 23)	<0,001

¹ medijan (raspon)

5.2.6. Izračunavanje prediktivnih faktora – respiratorne infekcije

Djeca koja su primila placebo (skupina B) imala su 2,88 puta veću šansu za razvoj respiratorne infekcije nego djeca koja su primila LGG (skupina A) (OR=2,88, CI 1,70 – 4,88). Ni spol niti mlađa dob nisu značajnije utjecali na broj respiratornih infekcija (tablica 28).

Tablica 28. Prediktori respiratornih infekcija: binarna logistička regresija.

Prediktor	OR (95% CI)	P vrijednost
Skupina B	2,88 (1,70 – 4,88)	<0,001
Ženski spol	0,65 (0,39 – 1,10)	0,108
Mlađa dob	1,02 (1,01 – 1,21)	0,001

5.2.7. Izračunavanje prediktivnih faktora – gastrointestinalne infekcije

Djeca koja su primila placebo (skupina B) nisu imala značajno veću šansu za razvoj gastrointestinalne infekcije (OR=1,72, CI 0,92 – 3,20) (tablica 29).

Tablica 29. Prediktori gastrointestinalnih infekcija: binarna logistička regresija.

Prediktor	OR (95% CI)	P vrijednost
Skupina B	1,72 (0,92 – 3,20)	0,089
Ženski spol	0,73 (0,39 – 1,36)	0,326
Mlađa dob	1,04 (0,98 – 1,08)	0,605

5.3. Nuspojave

Tijekom istraživanja nisu zabilježene nuspojave niti neželjeni štetni događaji niti u skupini djece koja je bila hospitalizirana na pedijatrijskom odjelu niti u djece u vrtiću.

6. RASPRAVA

Kao što je u uvodu rečeno, probiotici su živi mikroorganizmi koji imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina. Njihov učinak je višestruk i karakterizira ga djelovanje na više razina; na crijevnoj sluznici blokiraju djelovanje patogena tako da luče antibiotske supstance, snižavaju lokalni pH (101), smanjuju prijanjanje i patogenih bakterija i njihovih toksina na crijevni epitel (102). Osim toga, djeluju na regulaciju imunološkog odgovora crijevne sluznice međudjelovanjem s dendritičkim i epitelnim stanicama, započinju odgovor koji uključuje makrofage te T i B limfocite (107). Probiotici mogu poboljšati sposobnost borbe protiv infekcije, pojačavajući imunološki odgovor (99). To čine različitim mehanizmima, između ostalog, aktivacijom TLR sustava i Th1 odgovora te potiču stvaranje IL-12, IL-18 i INF- γ (128). Isto tako, promiču prirodenu imunost domaćina selektivno aktivirajući B limfocite na proizvodnju IgA koji smanjuje prodor bakterija kroz sluznicu (99). Jedna od značajnijih uloga probiotika je i njihov utjecaj na modulaciju imunološkog odgovora izjednačavanjem proizvodnje pro- i antiinflamatornih citokina (99).

Navedeni mehanizmi djelovanja otvaraju mogućnost različitim kliničkim primjenama, koje su na početku bile ograničene na crijevne bolesti i infekcije, a danas su njihove indikacije proširene. Upravo modulacija i stimulacija imunološkog odgovora, mogu opravdati uporabu probiotika, ne samo u liječenju već i u prevenciji infekcija. U pedijatrijskoj populaciji postoje dvije skupine bolesnika koje su posebice sklone razvoju infekcija – hospitalizirana djeca i djeca koja pohađaju kolektiv.

Učestalost je nozokomijalnih infekcija u djece vrlo visoka (5-44%) (187,188,189), čak i u razvijenim zemljama, poglavito crijevnih i respiratornih infekcija. Dosad provedene

mjere u njihovoj prevenciji nisu dale odgovarajuće rezultate, a svaka od tih infekcija produžuje boravak u bolnici, pogoršava ishod liječenja osnovne bolesti te, posljedično, bitno povišuje troškove (194,195).

Jednako tako, djeca koja pohađaju kolektiv (vrtić) oboljevaju čak 2 do 3 puta češće i od respiratornih i od gastrointestinalnih infekcija nego djeca koja ostaju kod kuće (196).

Povećan rizik od infekcije ima značajne socijalne i ekonomske implikacije najviše zbog troškova liječenja te odsutnosti roditelja s radnog mjesta (196,197).

Veličina navedenog problema, nepostojanje odgovarajućih mjera prevencije te znanstveni dokazi o imunomodulacijskom djelovanju probiotika bili su razlog pokretanja našeg istraživanja, čiji je cilj bio utvrditi može li LGG prevenirati gastrointestinalne i respiratorne infekcije u hospitalizirane djece i djece u kolektivu.

U ovoj raspravi usporedit će se rezultati našeg rada s dosad objavljenim rezultatima drugih istraživanja. Na kraju, na temelju dobivenih rezultata formulirati će se smjernice o mogućoj kliničkoj primjeni probiotika u navedenim indikacijama.

6.1. Probiotici u prevenciji nozokomijalnih infekcija

6.1.1. Prevencija gastrointestinalnih infekcija na dječjim bolničkim odjelima

Do sada su objavljene 4 randomizirane kontrolirane studije o ulozi probiotika u prevenciji proljeva u hospitalizirane djece (tablica 30).

Istraživanje provedeno na 81 hospitaliziranom djetetu (1 do 36 mjeseci) pokazalo je da primjena LGG-a u dozi od 6×10^9 CFU značajno smanjuje rizik od pojave proljeva (6,7% prema 33,3%; $p=0,002$) (156). Međutim, drugo, veće istraživanje, provedeno na 220 djece (1-18 mjeseci starosti)) nije potvrdilo pozitivan učinak (25,4% prema 30,2%; $p=0,4$) (157).

Kontradiktorni rezultati nađeni su i u istraživanjima koja su proučavala učinkovitost *B.bifidum* i *S. thermophilus* u prevenciji nozokomijalnog proljeva. U istraživanju koje je provedeno u bolnici s kronično bolesnom djecom (55 djece (5-24 mjeseci)) dokazana je učinkovitost dojenačke formule s navedenom kombinacijom probiotika (7% prema 31%; RR, 0,2; 95% CI 0,06-0,8) (158). Drugo ispitivanje (90 dojenčadi mlađe od 8 mjeseci), također provedeno u ustanovi s kronično bolesnom djecom, nije potvrdilo preventivnu učinkovitost probiotika (*B. lactis Bb12*, 28,3% prema 38,7%; RR 0,7; 95% CI 0,4-1,3) (159).

Iz gorenavedenog razvidno je da na temelju dosadašnjih podataka nije nemoguće dati ocjenu o ulozi probiotika u prevenciji nozokomijalnih proljeva, a to su i stavovi znanstvenih pregleda (83).

Naše istraživanje je provedeno na značajno većem broju bolesnika i u širem dobnom rasponu (1-18 godina). Rezultati su pokazali da primjena LGG-a smanjuje rizik od nozokomijalne gastrointestinalne infekcije za 60% (RR 0,4; 95% CI 0,25 do 0,7), odnosno za 2,89 puta, posebice u djece kod kojih hospitalizacija traje dulje (smanjuje vjerojatnost od razvoja infekcije za 9% svaki dan nakon trećeg dana boravka u bolnici). Osim toga, ne samo da je smanjen ukupan broj gastrointestinalnih infekcija, već je smanjen i broj epizoda povraćanja (RR 0,5, 95% CI 0,3 do 0,9), epizoda proljeva (RR 0,24, 95% CI 0,1 do 0,5), kao i težina infekcije ($p=0,001$).

Sukladno rezultatima i NNT je bio prihvatljiv, budući da 15-oro hospitalizirane djece treba uzimati LGG kako bi se spriječila jedna gastrointestinalna infekcija. Iako se to čini visokim, valja naglasiti da je svaki NNT niži od 4 zadovoljavajući ako je riječ o liječenju, dok se za prevenciju svaki broj manji od 40 smatra prihvatljivim (202).

Dosadašnje studije su pokazale da je učinak probiotika puno bolji u virusom uzrokovanim proljevima (192). Isto je potvrđeno i našim istraživanjem u kojem nitko od bolesnika nije imao bakterijsku infekciju. Većina je proljeva najvjerojatnije bila virusnog podrijetla, premda je to potvrđeno u samo pet bolesnika (rotavirus u dva bolesnika i norovirus u tri bolesnika).

Tablica 30. Prikaz dosadašnjih istraživanja o utjecaju probiotika na nozokomijalne gastrointestinalne infekcije na dječjem bolničkom odjelu.

Autor	N (dob, mj)	Probiotik (doza)	RR	NTT
Szajewska (156)	81 (1-36)	LGG (6×10^9 CFU)	0,2 (0,06 – 0,6)	4 (2-10)
Mastretta (157)	220 (1-18)	LGG (10^{10} CFU)	0,84 (0,6 – 1,3)	Nije značajan
Saavedra (158)	55 (5-24)	<i>B. lactis</i> Bb12 10^9 CFU/g + <i>S.</i> <i>thermophilus</i> 10^7 CFU/g	0,2 (0,06 – 0,8)	5 (3-20)
Chouraqui (159)	90 (<8)	<i>B. lactis</i> Bb12 (min. 10^8 CFU)	0,7 (0,4 – 1,3)	Nije značajan

6.1.2. Prevencija respiratornih infekcija na dječjim bolničkim odjelima

Ne postoje ispitivanja o utjecaju probiotika na nozokomijalne respiratorne infekcije.

Spominju se samo ona u bolesnika liječenih u jedinicama intenzivne njege; dva provedena u odraslih bolesnika (160,203) i jedna u kritično bolesnih pedijatrijskih bolesnika (161). Oba ispitivanja provedena u kritično bolesnih odraslih bolesnika upotrebljavala su simbiotike (laktobacili + vlakna) i pokazala su da uporaba simbiotika značajno smanjuje rizik od razvoja pneumonije (160,203).

Jedino pedijatrijsko ispitivanje provedeno je na 61 djetetu liječenom u jedinici intenzivne njege. Istraživanje nije pokazalo pozitivan učinak LGG-a na pojavu pneumonija, naprotiv, dvije pneumonije koje su zabilježene javile su se u bolesnika koji su primali LGG. Za napomenuti je da je ovo istraživanje provedeno na nedovoljnom broju bolesnika, da je dosta bolesnika odustalo tijekom ispitivanja i da je ukupno bilo vrlo malo infekcija za usporedbu (161).

Obzirom da do sada nisu provedena istraživanja o utjecaju probiotika na nozokomijalne infekcije nije bilo moguće dati odgovarajuće preporuke o njihovoj primjeni.

Naši su rezultati na velikom broju ispitanika pokazali da LGG smanjuje rizik od nozokomijalnih respiratornih infekcija za 62% (RR 0,38; 95% CI 0,18 do 0,85), odnosno za 3,17 puta. Rizik od razvoja respiratorne infekcije bio je veći u djece koja su dulje boravila u bolnici (6% za svaki dan nakon trećeg dana boravka u bolnici), kod mlađe djece (12% za svaku godinu manje) i kod djevojčica. Prva dva parametra su poznata

kao rizični čimbenici nastanka intrahospitalnih infekcija, međutim ženski spol se u nekim dosadašnjim istraživanjima pokazao protektivnim, što je suprotno našim rezultatima (204).

NNT za respiratorne infekcije iznosio je 30 i iako se broj čini velik, kao što je već navedeno, svaki NNT ispod 40 je značajan ako se pripravak koristi u prevenciji, a ne u liječenju (202).

Valja naglasiti da je od ukupnog broja respiratornih infekcija samo u jednog bolesnika (u skupini B) dijagnosticirana pneumonija, ostale su infekcije bile infekcije gornjih dišnih putova. Isto tako, samo je 5 bolesnika imalo bakterijski infekt te su stoga liječeni antibioticima (4/5 bilo je iz skupine B).

Međutim, LGG nije smanjio težinu infekcija ($p=0,077$), niti duljinu trajanja simptoma ($p=0,23$).

6.1.3. Podanaliza po dobnim skupinama

Podanaliza po dobnim skupinama pokazala je da su u svim dobnim skupinama djeca koja su uzimala LGG imala manje i gastrointestinalnih i respiratornih infekcija, međutim statistički značajna razlika nađena je samo za gastrointestinalne infekcije u najmlađoj dobnoj skupini (1-5 godina). Navedeno bi se moglo objasniti malim brojem bolesnika u svakoj skupini te je stoga osobito važan ukupan broj bolesnika, jer zadovoljava kriterije *power* analize.

6.1.4. Duljina trajanja hospitalizacije

Ukupna duljina trajanja hospitalizacije za skupinu A iznosila je (medijan) 5 dana, a za skupinu B (medijan) 4 dana. Navedena razlika nije se pokazala statistički značajnom ($p=0,109$) što se može objasniti činjenicom da je od ukupnog broja bolesnika svega 12% imalo intrahospitalnu infekciju. Stoga nije bilo za očekivati da se ukupan broj dana boravka poveća. Osim toga, veći broj infekcija bio je kratkog trajanja i blažeg kliničkog tijeka.

6.2. Prevencija infekcija u dječjem kolektivu

Djeca koja pohađaju vrtić imaju povišen rizik za razvoj gastrointestinalnih i respiratornih infekcija. Njihova bi prevencija bila od velikog značaja kako za obitelji, tako i za društvo. Na temelju dosadašnjih spoznaja, kontinuirana bi uporaba probiotika, modificirajući imuni odgovor, mogla prevenirati infektivne bolesti u djece u kolektivu (162). Međutim, na tu temu objavljeno je premalo studija s kontradiktornim rezultatima pa zasad nema jasnih smjernica (tablice 31 i 32).

Oberhelman et al. (163) je proučavao učinak probiotika u prevenciji proljeva u kolektivu u Peruu. Studija je provedena na 204 pothranjena dojenčeta i pokazala je da djeca koja su uzimala LGG imaju značajno manje proljeva od djece koja su uzimala placebo (5,21 vs 6,02 epizoda po djetetu na godinu; $p = 0,028$).

Drugo ispitivanje (164) provedeno je u Finskoj, a istraživao se učinak dugotrajnog uzimanja LGG-a na učestalost gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u djece ($N=571$) koja su pohađala dječji vrtić. Nije nađena značajna razlika u broju epizoda niti u broju dana s proljevom između djece koja su uzimala LGG i one koja su uzimala placebo. Unatoč tome, djeca koja su uzimala LGG imala su za 16% manji broj dana izostanka iz vrtića zbog gastrointestinalnih i respiratornih infekcija (4,9 prema 5,8 dana; $p = 0,03$) i smanjen rizik od liječenja antibiotikom (44% prema 54%; $p = 0,03$).

Slijedeće istraživanje usporedilo je utjecaj dvije vrste probiotika s placebom (210 dojenčadi) u vrtiću. Djeca su uzimala dojenačku formulu s *B. lactis*, *L. reuteri* ili bez probiotika (165). Dojenčad koja nije primala probiotik imala je češće proljev nego li ona

koja je uzimala bilo koji od probiotika. Osim toga, epizode s proljevom su bile duže.

Djeca koja su uzimala *L. reuteri* imala su i rjeđe epizode s povišenom temperaturom, manji broj posjeta liječniku, rjeđe su izostajala iz vrtića te su rjeđe dobivala antibiotike.

Saavedra (166) je proučavao učinak dugotrajne primjene probiotika (*B. lactis* i *S.*

thermophilus) u djece u vrtiću (118 djece, dob 3-24 mjeseca). Djeca koja su uzimala

dojenačku formula s probioticima imala su manje kolika ($P < 0,001$) i manje su koristila antibiotike ($P < 0,001$) od djece koja su uzimala placebo.

Rezultati navedenih ispitivanja sažeti su u preglednom radu (83), koji je potvrdio blagi pozitivni učinak nekih sojeva probiotika na sprječavanje infekcija u zdrave djece, no to nije bilo dovoljno za formuliranje preporuka o korisnosti njihove primjene.

Tablica 31. Prikaz dosadašnjih istraživanja o utjecaju probiotika na gastrointestinalne infekcije u djece u kolektivu (vrtić).

Autor	N (dob)	Probiotik (doza)	Učinak
Oberhelman (163)	204 (6-24 mj)	LGG (7×10^{10} CFU)	Manji broj epizoda s proljevom
Hatakka (164)	571 (1-6 god)	LGG (10^5 CFU)	Nije značajan
Saavedra (166)	118 (3-24mj)	<i>B. lactis</i> Bb12 10^7 CFU + <i>S. thermophilus</i> 10^6 CFU	Nije značajan
Weitzman (165)	210 (4-10 mj)	<i>B. lactis</i> Bb12 ili <i>L. reuteri</i> (min. 10^7 CFU)	Manji broj epizoda s proljevom (<i>L. reuteri</i>)

Tablica 32. Prikaz dosadašnjih istraživanja o utjecaju probiotika na respiratorne infekcije u djece u kolektivu (vrtić).

Autor	N (dob)	Probiotik (doza)	Učinak
Hatakka (164)	571 (1-6 god)	LGG (10^5 CFU)	Manji broj resp infekcija, bez smanjenja trajanja infekcije
Saavedra (166)	118 (3-24mj)	B. lactis Bb12 10^7 CFU + S. thermophilus 10^6 CFU	Nije značajan, manja učestalost uporabe antibiotika
Weitzman (165)	210 (4-10)	B. lactis Bb12 ili L. reuteri (10^7 CFU)	Nije značajan

Naše istraživanje provedeno je na skupini djece ($n=281$) u dobi od 1-7 godina koja su kontinuirano, tijekom 3 mjeseca uzimala testni pripravak.

Potvrđeno je da su djeca koja su uzimala LGG imala za 40% niži rizik za razvoj respiratornih infekcija (RR 0,63; 95% CI 0,51 do 0,79, NNT 5, 95% CI 3 do 8).

Dok su dosadašnji pozitivni rezultati pokazali smanjenje infekcija i gornjeg i donjeg dišnog sustava (164), našim istraživanjem nađeno je značajno smanjenje samo infekcija gornjih dišnih puteva. Statistički značajna razlika u riziku od infekcija donjih dišnih putova nije nađena, ali je važno napomenuti da je ukupan broj infekcija donjih dišnih putova u promatranim skupinama bio mali (ukupno 9). Ono što je značajno je vrlo nizak NNT za infekcije gornjih dišnih putova koji iznosi samo 5.

Jednako je važno da, osim što je smanjen ukupan rizik od razvoj infekcija gornjih dišnih putova, smanjen je i rizik od recidiva infekcije ($p=0,005$). Isto tako, LGG smanjuje težinu bolesti ($p<0,001$) i skraćuje trajanje infekcija ($p<0,001$). Međutim, ne smanjuje potrebu za uzimanjem antibiotika ($p=0,12$).

Glede vrste infekcija gornjih dišnih putova, u skupini koja je uzimala placebo nađeno je više svih infekcija gornjih dišnih putova - obična prehlada, faringitis, otitis, ali samo je razlika za prve dvije, koje su klinički blažeg tijeka, bila statistički značajna ($p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,053$ redom).

Na koncu možemo zaključiti da LGG smanjuje rizik od infekcija gornjih dišnih putova, smanjuje težinu infekcije i skraćuje njezino trajanje.

Govoreći o gastrointestinalnim infekcijama, u skupini koja je uzimala placebo bilo je više djece koja su razvila gastrointestinalnu infekciju, međutim, razlika nije bila statistički značajna (RR 0,63; 95% CI 0,38 do 1,06). Posljedično, nije nađena razlika u broju epizoda povraćanja niti proljeva (RR 0,60; 95% CI 0,29 do 1,24; RR 0,63; 95% CI 0,35-1,11) između skupina. Međutim, važno je napomenuti da, iako nije nađena značajna razlika u broju bolesnika s gastroenteralnim infektom, istraživanje je pokazalo da uporaba LGG-a smanjuje pojavu recidiva gastrointestinalnih infekcija ($p=0,008$). Iako su istraživanja o utjecaju probiotika na akutni gastreonteritis pokazala da uporaba probiotika smanjuje trajanje infekcije (83), našim istraživanjem nije potvrđeno skraćanje bolesti u skupini koja je uzimala LGG ($p=0,75$).

Naše istraživanje je potvrdilo dosadašnje rezultate - da uporaba LGG-a značajno smanjuje broj dana izostalih iz vrtića zbog respiratornih i gastrointestinalnih infekcija ($p<0,001$) (tablica 28).

6.3. Nuspojave

Budući da su probiotici živi mikroorganizmi i da su opisane infekcije uzrokovane probioticima, bilo je važno procijeniti njihovu sigurnost. Upravo stoga što su svi slučajevi infekcija zabilježeni u kronično bolesnih ili imunokompromitiranih bolesnika, iz našeg istraživanja isključili smo sve bolesnike s teškom kroničnom bolešću, one s imunomodulatornom terapijom, bolesnike sa zloćudnom bolesti, kao i one s imunodeficijenijom. U našem istraživanju tijekom cijelog intervencijskog razdoblja i na velikom broju ispitanika, nisu zabilježene nikave nuspojave niti neželjeni štetni događaji, koji se mogu povezati s uzimanjem testnog pripravka, niti u jednoj od skupina.

6.4. Klinička primjenjivost dobivenih rezultata

Dosadašnja istraživanja o prevenciji infekcija probioticima i provedene metaanalize nisu dale jasne smjernice o primjeni probiotika u hospitalizirane djece i djece u kolektivu. Autori su to objasnili nedovoljno velikim uzorcima objavljenih studija. No za konačne smjernice nije bitan samo broj ispitanika već se postavlja pitanje i sigurnosti i isplativosti preventivne primjene probiotika.

- A. Sigurnost. Već je navedeno da se kao moguće komplikacije uporabe probiotika spominju: a) prijenos antibiotske rezistencije, b) prijenos drugog genetskog materijala, c) uzrok infekcije. Iako su prve dvije komplikacije teoretski moguće, do sada nisu opisane. Premda je do sada opisano nekoliko slučajeva infekcije probiotskim bakterijama, one su se dogodile u kronično bolesne i imunokompromitirane djece. Stoga je ESPGHAN donio preporuke u kojima stoji da je mogućnost infekcije u imunokompetentne djece vrlo mala, odnosno jednaka mogućnosti infekcije vlastitom crijevnom florom (184). Važno je naglasiti da tijekom našeg istraživanja, koje je provedeno na velikom broju djece i tijekom dugog intervencijskog razdoblja, nije zabilježen niti jedan štetni događaj uzrokovan probioticima.
- B. Isplativnost. Nozokomijalne infekcije vrlo su česte na pedijatrijskim odjelima (incidencija je 5-44% u razvijenim zemljama) (187). Takve infekcije produžuju boravak u bolnici, pogoršavaju ishod liječenja osnovne bolesti te, posljedično, bitno povišuju troškove liječenja (194,195). Istraživanja su pokazala da

nozokomijalne gastrointestinalne infekcije i do deset puta povisuju troškove liječenja, što, kada se pretvori u konkretan trošak iznosi između 1930 i 2440 € po bolesniku (205,206). Jednak porast troškova hospitalizacije zabilježen je i za respiratorne infekcije (207).

Što se tiče troškova liječenja djeteta koje pohađa vrtić, oni su 3 do 4 puta viši od troškova liječenja djeteta koje ostaje kod kuće (199). Usto, na ukupne društvene troškove utječe i izostanak roditelja s posla. Smatra se da je prosječan izostanak roditelja s posla za 40% veći ako je dijete u vrtiću te ukupno takav roditelj izgubi oko 0,5 dana na bolovanje po mjesecu u usporedbi s 0,3 onih čija djeca ne pohađaju vrtić (199).

Iz navedenog je razvidno da su troškovi koji nastaju zbog intrahospitalnih infekcija i infekcija u kolektivu izuzetno visoki te da bi njihova prevencija imala neposredan pozitivan ekonomski utjecaj. Međutim, budući da cijena probiotičkog pripravka nije zanemariva, za odgovor na pitanje je li uporaba probiotika u navedene svrhe ekonomski isplativa, potrebna je dobro provedena *“cost-benefit”* analiza.

- C. Opravdanost primjene. Ako gledamo isključivo učinak na infekcije, možemo reći da smo dokazali da je uporaba probiotika opravdana jer: a) smanjuje broj i težinu gastrointestinalnih nozokomijalnih infekcija, b) smanjuje broj respiratornih nozokomijalnih infekcija, c) u djece u kolektivu smanjuje broj infekcija gornjih dišnih putova, njihovo trajanje i težinu te mogućnost za razvoj slijedeće infekcije, d) kod djece u kolektivu koja su imala jednu

gastrointestinalnu infekciju smanjuje mogućnost slijedeće, e) smanjuje broj dana izostalih iz vrtića zbog respiratornih i gastrointestinalnih infekcija.

6.4.1. Klinička primjenjivost probiotika u dječjim bolnicama

Naše istraživanje je pokazalo da LGG značajno smanjuje broj nozokomijalnih respiratornih i gastrointestinalnih infekcija. Međutim, većina infekcija tijekom ove studije bila je kratkog trajanja i nedokazane etiologije. Osim toga, intrahospitalne infekcije nisu produljile hospitalizaciju, a potrebno je dodati i relativno visok NNT za respiratorne infekcije koji je iznosio 30. Slijedom navedenog, prevencija LGG-om vjerojatno nije opravdana u sve djece, stoga definiranje skupine djece koja bi imala najviše koristi od takve prevencije smatramo najvažnijim doprinosom ovog rada. Na temelju naših rezultata i provedene logističke regresije, najveću korist od probiotika imaju:

- mlađa djeca (predškolske dobi);
- djeca kod koje očekujemo da će hospitalizacija trajati dulje;
- djeca hospitalizirana u doba godine kada očekujemo veći broj infekcija;
- ako je epidemiološka situacija na odjelu loša, odnosno zbog većeg broja zaražene djece očekujemo da će se infekcije brže širiti.

Valja, međutim, naglasiti da pojedine skupine djece, koja su posebno sklona infekcijama tijekom hospitalizacije, u ovo istraživanje nismo uključili. To su:

1. Dojenčad. Zbog prirode pripravka (100 ml fermentirnog mliječnog pripravka) u naše istraživanje nismo mogli uključiti dojenčad te se zbog toga podaci ne mogu ekstrapolirati na navedenu populaciju. Premda, ne postoji niti jedan fiziološki razlog zbog kojeg probiotici ne bi imali jednak učinak i u dojenačkoj populaciji, za izradu smjernica nužno je provesti istraživanje i u djece mlađe od 12 mjeseci.
2. Kronično bolesna djeca. Riječ je, u prvom redu, o djeci s kroničnim crijevnim bolestima, kod kojih crijevne infekcije bitno pogoršavaju podležeću bolest. Obzirom na jasno dokazanu preventivnu ulogu probiotika, smatramo da bi navedena populacija imala veliku korist od njihove uporabe. Međutim, za konačnu preporuku potrebno je provesti istraživanje kojim bismo obuhvatili navedenu skupinu bolesnika.
3. Imunokompromitirana djeca. Ova skupina djece bi svakako imala koristi od prevencije infekcija, ali ne treba zaboraviti na mogućnost infekcije samim probioticima, koliko god ona bila mala. Za točne preporuke o primjeni, i u ovoj skupini potreban je neposredan dokaz, prvenstveno glede sigurnosti, ali i učinkovitosti primjene.

6.4.2. Klinička primjenjivost probiotika u dječjem kolektivu

Primjena probiotika u vrtiću pokazala se sigurnom; značajno je smanjen broj infekcija gornjih dišnih putova, recidiva istih kao i recidiva gastrointestinalnih infekcija. Osim toga, smanjen je i izostanak iz vrtića zbog navedenih infekcija. Međutim, treba napomenuti da je većina infekcija bila blaga (obična prehlada, faringitis) i nepoznatog uzročnika.

Uzimajući sve navedeno u obzir, poglavito sigurnost pripravka, smatramo da nema razloga da se njegova primjena ne preporuči svoj djeci. Jedini argument protiv trajne uporabe probiotika u sve djece je njegova cijena. Stoga uporabu LGG-a u dječjim kolektivima preporučamo u slijedećim okolnostima/indikacijama:

- kod djece mlađe predškolske dobi;
- kod djece s recidivirajućim infekcijama gornjih dišnih putova;
- kod djece s recidivirajućim gastrointestinalnim infekcijama;
- u situacijama kada to nalaže epidemiološka situacija vrtića (velik broj zaražene djece).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu statističke obrade prikupljenih podataka o utjecaju LGG-a na pojavu gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u kolektivu s ciljem njihove moguće prevencije, moguće je zaključiti slijedeće:

1. Primjena LGG-a je sigurna. Tijekom istraživanja nisu zabilježene nuspojave niti neželjeni štetni događaji niti u skupini djece koja je bila hospitalizirana na pedijatrijskom odjelu niti u djece u vrtiću.

Zaključci koji se odnose na hospitaliziranu djecu:

1. LGG prevenira razvoj nozokomijalnih gastrointestinalnih infekcija. Vjerojatnost da razviju nozokomijalnu gastrointestinalnu infekciju bila je gotovo 3 puta manja u djece koja su uzimala LGG. Osim toga, smanjen je broj epizoda povraćanja i epizoda proljeva, a infekcije su bile blažeg tijeka. Sukladno navedenim rezultatima, NNT je bio nizak i iznosio je 15.
2. LGG prevenira razvoj nozokomijalnih respiratornih infekcija. Slično tome, rizik od respiratornih infekcija bio je 3 puta niži u skupini koja je uzimala LGG. NNT je iznosio 30, što se smatra značajnim za pripravak koji se koristi u preventivne svrhe. Međutim, nije smanjena težina infekcija niti njihovo trajanje.
3. Primjena LGG-a u bolnici, u klinički indiciranim slučajevima, učinkovit je i bezopasan način u prevenciji nozokomijalnih infekcija. Slijedom navedenog

mogu se preporučiti u: a) mlađe djece (predškolske dobi), b) kod duljeg trajanja hospitalizacije, c) u doba godine kada očekujemo veći broj infekcija, d) kada to zahtijeva epidemiološka situacija na odjelu (veći broj već zaražene djece te stoga veća mogućnost širenja infekcije).

Zaključci koji se odnose na djecu u kolektivu:

1. LGG smanjuje rizik od infekcija gornjih dišnih putova u djece u kolektivu.

Uporabom LGG-a za 3 puta se smanjuje rizik od razvoja infekcija gornjih dišnih putova, uz izrazito nizak NNT koji je samo 5. Osim toga smanjuje se mogućnost ponovne infekcije, a ukoliko i dođe do infekcija one su blaže i traju kraće.

2. LGG ne smanjuje rizik od gastrointestinalnih infekcija u kolektivu. Iako je u

skupini djece koja su uzimala placebo bilo više onih koja su tijekom intervencije imala gastrointestinalne infekcije, razlika se nije pokazala statistički značajnom. Međutim, LGG smanjuje ponovnu pojavu gastrointestinalne infekcije u djece koja su je već preboljela.

3. LGG smanjuje izostajanje iz vrtića zbog gastrointestinalnih i respiratornih infekcija.

4. LGG ne smanjuje uporabu antibiotika.

5. Slijedom navedenog, treba ih primijeniti u: a) djece mlađe predškolske dobi, b) kod djece s recidivirajućim respiratornim i/ili gastrointestinalnim

infekcijama, c) kada to nalaže epidemiološka situacija u vrtiću (veći broj zaražene djece, lakša mogućnost širenja infekcije).

8. SAŽETAK

Uvod: Cilj našeg je istraživanja bio odrediti ulogu *Lactobacillus GG* (LGG) u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u dječjem vrtiću. Hipoteza je da primjena LGG-a smanjuje broj gastrointestinalnih i/ili respiratornih infekcija u navedenim populacijama.

Ispitanici i metode: Proveli smo randomiziranu, dvostruko slijepu, placebo kontroliranu studiju na 742 hospitalizirane djece i 281 djetetu koje pohađa dječji vrtić. Ispitanici su randomizirani u dvije skupine od kojih je jedna uzimala LGG u dozi od 10^9 CFU u 100 ml fermentiranog mliječnog pripravka, a druga placebo, odnosno fermentirani mliječni pripravak bez LGG-a.

Rezultati – hospitalizirana djeca: U LGG skupini, u usporedbi s placebom, našli smo značajno niži rizik od gastrointestinalnih infekcija (RR 0,4; 95% CI 0,25 – 0,7; NNT 15, 95% CI 9 - 34) i respiratornih infekcija (RR 0,38; 95% CI 0,18 – 0,85; NNT 30, 95% CI 16 - 159).

Rezultati – djeca u dječjem vrtiću: U usporedbi s placebom, djeca koja su uzimala LGG imala su značajno smanjen rizik od infekcija gornjeg dišnog sustava (RR 0,66; 95% CI 0,52 – 0,82; NNT 5, 95% CI 4 - 10), ali nisu imala smanjen rizik od gastrointestinalnih infekcija (RR 0,63; 95% CI 0,38 – 1,06).

Zaključak: Primjena LGG-a može se preporučiti kao valjana mjera u smanjenju rizika od infekcija gornjih dišnih putova u djece u vrtiću te nozokomijalnih gastrointestinalnih i respiratornih infekcija na pedijatrijskim odjelima. Slijedom navedenog njihova primjena može se preporučiti: 1) na bolničkim odjelima: a) mlađe djece (predškolske dobi), b) kod duljeg trajanja hospitalizacije, c) u doba godine kada očekujemo veći broj infekcija,

d) kada to zahtijeva epidemiološka situacija na odjelu (veći broj već zaražene djece te stoga veća mogućnost širenja infekcije); 2) u dječjim vrtićima: a) u djece mlađe predškolske dobi, b) u djece s recidivirajućim respiratornim i/ili gastrointestinalnim infekcijama, c) kada to nalaže epidemiološka situacija u vrtiću (veći broj zaražene djece, lakša mogućnost širenja infekcije)

9. SUMMARY

Objective: The aim of our study was to investigate the role of *Lactobacillus GG* (LGG) in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in hospitalised children and children who attend day care centres. The primary hypothesis was that the administration of LGG would reduce the number of gastrointestinal and/or respiratory infections in studied population.

Patients and Methods: We conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in 742 hospitalised children and 281 children who attend day care centres. They were randomly allocated to receive either LGG at a dose of 10^9 CFU in 100 ml of a fermented milk product or placebo which was the same fermented milk product without LGG.

Results – hospitalized children: In the LGG group, compared to the placebo group, we found a significantly reduced risk of gastrointestinal (RR 0,4; 95% CI 0,25 – 0,7; NNT15, 95% CI 9 - 34) and respiratory tract infections (RR 0,38; 95% CI 0,18 – 0,85; NNT 30, 95% CI 16 - 159).

Results – children in day care centre: Compared to the placebo group, children in the LGG group had a significantly reduced risk of upper respiratory tract infections (RR 0,66; 95% CI 0,52 – 0,82; NNT 5, 95% CI 4 - 10), but had no significant reduction in the risk of gastrointestinal infections (RR 0,63; 95% CI 0,38 – 1,06).

Conclusion: LGG administration can be recommended as a valid measure for decreasing the risk of upper respiratory tract infections in children attending day care centres and for decreasing the risk of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections in paediatric facilities. Therefore their use can be recommended: 1) For

hospitalized children: a) in children of younger age (preschool children), b) in prolonged hospitalization, c) during the time of the year with increased infections incidence, d) during outbreaks of hospital infections (increased possibility of infection spreading); 2) In day care centres: a) in children of younger age, b) in children with recurrent gastrointestinal and/or respiratory tract infections, c) during outbreaks of respiratory/gastrointestinal infections (increased possibility of infection spreading).

10. LITERATURA

1. Christopher Duggan, John B. Watkins, W. Allan Walker. Nutrition in Pediatrics: Basic Science, Clinical applications. Poglavlje: ImEdition: 4, illustrated. Published by PMPH-USA, 2008.
2. Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamma Bowel Dis* 2001;7:43-50.
3. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009;136:65-80.
4. Maaser C, Kagnoff MF. Role of intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Gastroenterology* 2002;40:525-9.
5. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009;44:26-46.
6. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303:1662–5.
7. de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, et al. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cellpolarizing signals. *J Immunol* 2002;168:1704–1709.
8. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688-93.

9. Iweala OI, Nagler CR. Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev* 2006;213:82-100.
10. Kolaček S. Imunost probavnog sustava. *Paediatr Croat* 2005; 49(Supl 1):89-93.
11. Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JL. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 2004;5:569–573.
12. Smith DW, Nagler-Anderson C. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 2005;174:3851–3857.
13. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177–180.
- 19.
14. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6688–6692.
15. Fowler S, Powrie F. CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance. *Eur J Immunol* 2002;32:2997–3006.
16. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005;206:232–259.,
17. Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann NY Acad Sci* 2004;1029:1–8.

18. Macpherson AJ, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med* 2006;203:497–500.
19. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229–241.
20. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987–995.
21. Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/, HeJ mice. *J Exp Med* 1982;155:605–610.
22. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI: Creating and maintaining the gastrointestinalesystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1157–1170.
23. Guarner F, Malagelada JR: Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512–519.
24. Shanahan F. The host–microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:915–931.
25. Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect Biol Med* 1992;35:251–260.
26. Kligler B, Hanaway P, Cohrsen A . Probiotics in children. *Pediatr Clin North Am* 2007;54:949-67.
27. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69(Suppl):1035S–45S.

28. Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr* 1977;91: 298–301.
29. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983; 72: 317–21. 9
30. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61–67.
31. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:19–25.
32. Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 2004;12:562–8.
33. Fanaro S, Chierici P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003;441:48–55
34. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3202–07.
35. Sartor RB. Probiotic therapy for intestinal inflammation and infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:44–50.

36. DeLa Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, et al. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 2005;43:5588–92.
37. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:129–34
38. Borriello SP. Microbial flora of the gastrointestinal tract. In: Hill MJ ed. *Microbial metabolism in the digestive tract*. Boca Raton: CRC Press, 1986: 2–16.
39. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. *Gut* 1998; 42: 2–7.
40. Levison ME. Intra-abdominal infections. In: Stein JH ed. *Internal Medicine*. Boston: Little, Brown, and Co, 1990: 1274–81.
41. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion*. 2006;73 Suppl 1:5-12.
42. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How hostmicrobial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002;22:283–307.
43. Smith EA, Macfarlane GT: Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 288–302.
44. Backhed F, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15718–15723.

45. Kligler B. Probiotics in Children. *Pediatr Clin North Am* 2007;54:949-967.
46. Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 2000; 100: 119–130. 15
47. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002; 298: 1414–1427.
48. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:478–485.
49. Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:315–37.
50. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483–89
51. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, et al. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646–52.
52. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct rDNA community analysis reveals a myriad of novel bacterial lineages within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799–807.

53. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Okada Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993; 79: 32–37.
54. Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996; 89: 494–501.
55. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 1998; 6: 13–18.
56. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997; 159: 1739–45.
57. Neish AS, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science* 2000;289:1560–1563.
58. Collier-Hyams LS, Sloane V, Batten BC, Neish AS. Cutting edge: bacterial modulation of epithelial signaling via changes in neddylation of cullin-1. *J Immunol* 2005;175:4194–4198. Kelly D, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR γ and RelA. *Nat Immunol* 2004;5:104–112.

59. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology* 2005;115:153–162.
60. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000;288:2222–2226.
61. Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 2000;13:443–451.
62. Castigli E, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3903–3908.
63. Castigli E, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 2005;201:35–39.
64. Mestecky J. et al. *Mucosal Immunology*, 3rd Edition. Chapter 18: The Role of Mucosal Microbiota. Academic Press 2004;353-354.
65. Schrezenmeier J, de Vriese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl):361S–4S
66. Farnworth ER. *Handbook of Fermented Functional Foods*, Chapter: History and Culture Related to Fermented Food; CRC Press 2003;14-115.
67. Tissier H. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 1984;3:11–28.
68. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Med Klin* 1918;2:29-30.

69. Rettger LF, Levy MN, Weinstein L, Weiss JE. *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application. London: Yale University Press, 1935.
70. Heasman, Michael and Mellentin, Julian "The Functional Foods Revolution" Earthscan Publications Ltd. 2001.
71. US patent 4839281
72. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1231–3.
73. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987;70:1–12.
74. Hamilton-Miller JMT. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic' *British Journal of Nutrition* 2003;90:845.
75. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* 1965;147:747–8.
76. Sperti GS. Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co, 1971.
77. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974;29:4–8.
78. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365–78.
79. Havenaar R, Huis In't Veld MJH. Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1992.
80. Sminen S. Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr News Lett* 1996;5:16–8.

81. Salminen S, von Wright A, Morelli L, et al. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol* 1998;44:93-106.
82. FAO/WHO (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
83. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:454-75.
84. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001;73:365S-373S.
85. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2004;97:147-56.
86. Lee YK, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995;6:241-5.
87. Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:487-513.
88. Lee YK, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995;6:241-5.

89. Xu J, Mahowald MA, Ley RE, et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* 2007;5:156.
90. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355–1359.
91. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80:S147–71.
92. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73:444S–450S.
93. Pédrón T, Sansonetti P. Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing ménage à trois. *Cell Host Microbe* 2008;3:344–7.
94. Arvanitoyannis IS, Van Houwelingen-Koukaliaroglou M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:385–404.
95. Saavedra JM. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr Clin Pract* 2007;22:351–65.
96. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev* 2005;3:777–788.
97. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:405–440.
98. Morgan SM, O'Connor PM, Cotter PD, et al. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial

- activity at nanomolar concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2606–2611.
99. Vanderpool C, Yan F, Polk DB. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1585-96.
100. Collado MC, Hernandez M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *J Food Prot* 2005;68:1034 – 1040.
101. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* 2006;157:241–247.
102. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 2007;45:454–460.
103. Candela M, Seibold G, Vitali B, et al. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol* 2005;156:887– 895.
104. Mukai T, Kaneko S, Matsumoto M, et al. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int J Food Microbiol* 2004;90:357–362.

105. Sun J, Le GW, Shi YH, et al. Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:79–85.
106. Tallon R, Arias S, Bressollier P, et al. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *J Appl Microbiol* 2007;102:442–451.
107. Kraehenbuhl JP, Corbett M. Immunology. Keeping the gut microflora at bay. *Science* 2004;303:1624–1625.
108. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005;147:186–191.
109. Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilahti E. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/ dermatitis syndrome infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:65–71.
110. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995;13:310–312.
111. Bakker-Zierikzee AM, Tol EA, Kroes H, et al. Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:134–140.
112. He F, Morita H, Kubota A, et al. Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. *Microbiol Immunol* 2005;49:993–997

113. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, et al. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:764–771.
114. Braat H, de Jong EC, van den Brande JM, et al. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. *J Mol Med* 2004;82:197–205.
115. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604–1610.
116. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804–1808.
117. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:333–338.
118. Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 2004;72:3299–3309.
119. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602–1609.
120. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function

- through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1260–1267.
121. Pena JA, Rogers AB, Ge Z, et al. Probiotic *Lactobacillus* spp. diminish *Helicobacter hepaticus*-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 2005;73:912–920.
 122. Sheil B, MacSharry J, O’Callaghan L, et al. Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin Exp Immunol* 2006;144:273–280.
 123. Lu L, Walker A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium^{1–3}. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1124S–1130S.
 124. Pena JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol* 2003;5:277–285.
 125. Kim SO, Sheikh HI, Ha SD, et al. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol* 2006;8:1958–1971.
 126. Matsumoto S, Hara T, Hori T, et al. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2005;140:417–426.

127. Sturm A, Rilling K, Baumgart DC, et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun* 2005;73:1452–1465.
128. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2880–2885.
129. Jijon H, Backer J, Diaz H, et al. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004;126:1358 – 1373.
130. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 2003;9:831– 835.
131. Cario E, Podolsky DK. Toll-like receptor signaling and its relevance to intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:332–338.
132. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126:520 –528.
133. Lee J, Mo JH, Katakura K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327–1336.
134. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 2002;3:354–359.

135. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol* 2005;35:2471–2476.
136. Zyrek AA, Cichon C, Helms S, et al. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 2007;9:804–816.
137. Parassol N, Freitas M, Thoreux K, et al. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol* 2005;156:256–262.
138. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF α - and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006;130:731–746.
139. Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, et al. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1018–1030.
140. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, et al. NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004;72:5750–5758.
141. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003;4:269–273.

142. Yan F, Cao H, Cover TL, et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007;132:562–575.
143. Floch MH, Walker WA, Guandalini S, Hibberd P, Gorbach S, Surawicz C, Sanders ME, Garcia-Tsao G, Quigley EM, Isolauri E, Fedorak RN, Dieleman LA. Recommendations for probiotic use--2008. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:S104-8.
144. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, et al. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *The Cochrane Database Of Systematic Reviews* 2003, Issue 4.
145. Van Niel C, Feudtner C, Garrison MM, et al. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678-84.
146. Szajewska H, Mrukowicz J. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:S17-S25.
147. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with Lactobacillus GG. *Lancet* 1987;2:1519.
148. Biller JA, Katz AJ, Flores AF, et al. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with Lactobacillus GG. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:224–226.
149. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989;96:981–988.

150. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995;90:439–448.
151. Bleichner G, Blehaut H, Mentec H, et al. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multi-center, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intensive Care Med* 1997;23:517–523.
152. Johnston BC, Supina AL, Ospina M, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD004827.
153. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a doubleblind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305–309.
154. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202–1209.
155. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, et al. Once-daily high-dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004;53:108–114.
156. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz J, et al. *Lactobacillus GG* in prevention of diarrhea in hospitalized children. *J Pediatr* 2001;138:361-5.

157. Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, et al. Lactobacillus GG and breast feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:527-31.
158. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, et al. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
159. Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC. Acidified milk formula supplemented with Bifidobacterium lactis: impact on infant diarrhea in residential care settings. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:288-92.
160. Spindler-Vesel A, Bengmark S, Vovk I, Cerovic O, Kompan L Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. *JPEN* 2007;31:119-26.
161. Honeycutt TC, El Khashab M, Wardrop RM 3rd et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Med* 2007;8:452-8.
162. Widdowson MA, Bresee JS, Gentsch JR, et al. Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;21:26-31.
163. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, et al. A placebocontrolled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999;134:15-20.

164. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Br Med J* 2001;22:1327-31.
165. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 2005;115:5-9.
166. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, et al. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004;79:261-7.
167. Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:457-8.
168. Salminen S, von Wright A, Morelli, et al. Demonstration of safety of probiotics—a review. *Int J Food Microbiol* 1998;44:93–106. Piarroux R, Millon L, Bardonnet K, et al. Are live *Saccharomyces* yeasts harmful to patients? *Lancet* 1999;353:1851–2.
169. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999;28:1159–60.
170. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, et al. *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis* 1997;25:1048–55.
171. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 2001;73:465S–70S.

172. Thompson C, McCarter Y, Krause PJ, et al. *Lactobacillus acidophilus* sepsis in a neonate. *J Perinatol* 2001;21:258–60.
173. Bayer AS, Chow AW, Betts D, et al. Lactobacillemia: report of nine cases. Important clinical and therapeutic considerations. *AmJ Med* 1978;64:808–13.
174. Broughton RA, Gruber WC, Haffar AA, et al. Neonatal meningitis due to *Lactobacillus*. *Pediatr Infect Dis* 1983;2:382–4.
175. Sharpe ME, Hill LR, Lapage SP. Pathogenic lactobacilli. *J Med Microbiol* 1973;6:281–6.
176. Kalima P, Masterton RG, Roddie PH, et al. *Lactobacillus rhamnosus* infection in a child following bone marrow transplant. *J Infect* 1996;32:165–7.
177. Brook I. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infections in children. *J Med Microbiol* 1996;45:21–6.
178. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999;28:1159–60.
179. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, et al. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:290–2.
180. Spinosa MR, Wallet F, Courcol RJ, et al. The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? *Microb Ecol Health Dis* 2000;12:99–101.

181. Oggioni MR, Pozzi G, Balensin PE, et al. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:325–6.
182. Richard V, Auwera P, Snoeck R, et al. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:783–5.
183. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002;35:1155-60.
184. ESPGHAN Committee on Nutrition. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:365-74.
185. Struelens MJ. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital-acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ* 1998;317:652–654.
186. World Health Organization, Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. Prevention of hospital-acquired infections; WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12.
187. Welliver R, McLaughlin S. Unique epidemiology of nosocomial infection in children's hospital. *Am J Dis Child* 1984;138:131-135.
188. Daschner F, Saal E. Nosocomial infection in children's hospital. *Monatsschr Kinderheilkd* 1981;1129:578-580.
189. Derter OP. Nosocomial infection in children's hospital. A retrospective study. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1986;30:149-153.

190. Ford-Jones EL, Mindorff CM, Gold R, et al. The incidence of viral-associated diarrhea after admission to a pediatric hospital. *Am J Epidemiol* 1990;131:711-8.
191. Ponce MF, Rial MJ, Alarcon N, Szefer M, Aguilar MD. Use of a prospectively measured incidence rate of nosocomial diarrhea in an infant/toddler ward as a meaningful quality assessment tool. *Clin Perform Qual Health Care* 1995;3:128-31.
192. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 2006;6:374-82.
193. Raymond J, Aujard Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:260-3.
194. Plowman R et al. The socio-economic burden of hospital-acquired infection. London, Public Health Laboratory Service and the London School of Hygiene and Tropical Medicine, 1999.
195. Wenzel RP. The economics of nosocomial infections. *J Hosp Infect* 1995;31:79-87.
196. Lu N, Samuels ME, Shi L, Baker SL, Glover SH, Sanders JM. Child day care risks of common infectious diseases revisited. *Child Care Health Dev* 2004;30:361-8.
197. Nurmi T, Salminen E, Pönkä A. Infections and other illnesses of children in day-care centers in Helsinki. II: the economic losses. *Infection* 1991;19:331-5.

198. Carabin H, Gyorkos TW, Soto JC, Penrod J, Joseph L, Collet J-P. Estimation of direct and indirect costs because of common infections in toddlers attending day care centers. *Pediatrics* 1999;103:556-64.
199. Bell DM, Gleiber DW, Mercer AA, Phifer R, Guinter RH, Cohen AJ, Epstein EU, Narayanan M. Illness associated with child day care: a study of incidence and cost. *Am J Public Health* 1989;79:479-84.
200. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990;22:259-67.
201. Moher D, Schulz KF, Altman DG. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 2001;357:1191-4.
202. No authors listed. Calculating and Using NNTs. *Bondolier extra*. February 2003.
203. Rayes N, Hansen S, Seehofer D, et al. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 2002;18:609-615.
204. Koch A, Sørensen P, Homøe P, et al. Population-based study of acute respiratory infections in children, Greenland. *Emerg Infect Dis* 2002;6:586-93.
205. Piednoir E, Bessaci K, Bureau-Chalot F, Sabouraud P, Brodard V, Andréoletti L, Bajolet O. Economic impact of healthcare-associated rotavirus infection in a paediatric hospital. *J Hosp Infect* 2003;55:190-5.

206. Frühwirth M, Berger K, Ehlken B, Moll-Schüler I, Brösl S, Mutz I. Economic impact of community- and nosocomially acquired rotavirus gastroenteritis in Austria. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:184-8.
207. Macartney KK, Gorelick MH, Manning ML, Hodinka RL, Bell LM. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. *Pediatrics* 2000;106:520-6.

11. PRILOZI

Informirani pristanak – za roditelje ili skrbnike djece u bolnici

Lactobacillus GG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija kod djece u kolektivu

Što su probiotici?

Probiotici se definiraju kao živi mikro-organizmi koji imaju dokazani pozitivan učinak na zdravlje ljudi.

Što su infekcije u kolektivu?

Poznato je da se postotak intrahospitalnih infekcija kreće oko 14-17%, a najviše se odnosi na respiratorne (prehlada, upala grla, upala uha, bronhitis...) i gastrointestinalne infekcije (proljev, povraćanje) u odnosu na djecu koja nisu u kolektivu.

Na koji način će se provoditi prevencija?

U suradnji s Dukatom provest će se studija kojom će se pokušati dokazati pozitivan učinak probiotika na smanjenje infekcija u djece.

Sva djeca hospitalizirana na Klinici za pedijatriju čiji roditelji potpišu informirani pristanak, tijekom boravka u bolnici uzimat će mliječni pripravak (jogurt) koji će donirati Dukat. Djeca će biti podijeljena u dvije skupine. Jedna će uzimati jogurt, a druga jogurt s probiotikom. Nakon provedene studije utvrdit će se jesu li djeca koja su uzimala probiotik imala manje intrahospitalnih infekcija.

Što je važno?

Važno je znati da će djeca biti podijeljena u dvije skupine i da trebaju uzimati samo pripravak koji je namijenjen skupini kojoj dijete pripada.

Tko sudjeluje?

Mogu sudjelovati djeca od 1-18 godina koja su hospitalizirana na Klinici za pedijatriju Klinike za dječje bolesti

Tko ne može sudjelovati?

Ne mogu sudjelovati djeca alergična na kravljе mlijeko ili djeca koja iz nekog drugog razloga ne mogu uzimati mliječne proizvode, djeca koja su imunosuprimirana, teško bolesna ili koja imaju tumorsku bolest ili već uzimaju prebiotike ili probiotike.

Zašto bih ja, kao roditelj, dozvolio sudjelovanje svoga djeteta?

Obzirom na učestalost intrahospitalnih infekcija u djece bilo bi važno znati mogu li se iste i prevenirati. Ako se ta mogućnost potvrdi, na taj bi se način moglo smanjiti širenje infekcija u dječjim bolnicama, kao i duljina boravka u bolnici.

Koji su rizici?

Rizik uzimanja probiotika je vrlo mali što potvrđuju i stavovi Europskog povjerenstva za prehranu djece.

Odobrenja?

Navedenu studiju odobrilo je Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb i Medicinskog fakulteta.

Kome se obratiti za dodatne informacije?

Sve dodatne informacije možete dobiti na:

Iva Hojsak, dr.med.

Klinika za dječje bolesti Zagreb

Tel. 01/4600-130

e-mail:ivahojsak@gmail.com



INFORMIRANI PRISTANAK

Upoznata/upoznat sam s primjenom probiotika i s prirodom samog pripravka.

Stoga pristajem da moje dijete tijekom hospitalizacije uzima navedeni pripravak. Također sam upoznata/upoznat s istraživanjem i činjenicom da jedna skupina djece uzima placebo, odnosno fermentirani mliječni pripravak, a druga skupina djece fermentirani mliječni pripravak s probioticima.

Imala/imao sam dovoljno vremena da o svemu razmislim, na sva pitanja koja sam postavila/postavio, dobila/dobio sam odgovore.

Pristajem da se rezultati svi podaci dobiveni istraživanjem mogu koristiti u znanstvene svrhe, isključivo anonimno.

Ime i prezime djeteta _____

Ime i prezime roditelja ili skrbnika _____

Potpis roditelja ili skrbnika _____

Ime osobe koja me je upoznala s gore navedenim _____

Potpis liječnika _____

U Zagrebu, dana _____

Informirani pristanak – za roditelje ili skrbnike djece u vrtiću

Lactobacillus GG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija kod djece u kolektivu

Što su probiotici?

Probiotici se definiraju kao živi mikro-organizmi koji imaju dokazani pozitivan učinak na zdravlje ljudi.

Što su infekcije u kolektivu?

Poznato je da djeca u kolektivu 3-5 puta češće oboljevaju od respiratornih (prehlada, upala grla, upala uha, bronhitis...) i gastrointestinalnih infekcija (proljev, povraćanje) u odnosu na djecu koja nisu u kolektivu.

Na koji način će se provoditi prevencija?

U suradnji s Klinikom za dječje bolesti i Dukatom provest će se studija kojom će se pokušati dokazati pozitivan učinak probiotika na smanjenje infekcija u djece.

Sva djeca u vrtiću čiji roditelji potpišu informirani pristanak, tijekom tri mjeseca uzimat će mliječni pripravak (jogurt) koji će donirati Dukat. Djeca će biti podijeljena u dvije skupine. Jedna će uzimati čisti jogurt, a druga jogurt s probiotikom. Nakon tri mjeseca utvrdit će se jesu li djeca koja su uzimala probiotik imala manje infekcija u kolektivu.

Što je važno?

Važno je znati da će djeca biti podijeljena u dvije skupine i da trebaju uzimati samo pripravak koji je namijenjen skupini kojoj dijete pripada.

Tko sudjeluje?

Mogu sudjelovati djeca od 1-7 godina koja pohađaju Dječji vrtić Matije Gupca.

Tko ne može sudjelovati?

Ne mogu sudjelovati djeca alergična na kravlje mlijeko ili djeca koja iz nekog drugog razloga ne mogu uzimati mliječne proizvode, teško bolesna djeca, djeca koja imaju imunodeficijsnciju ili tumorsku bolest te djeca koja već uzimaju pripravak s prebiotikom ili probiotikom.

Zašto bih ja, kao roditelj, dozvolio sudjelovanje svoga djeteta?

Obzirom na veliku učestalost infekcija u dječjem kolektivu bilo bi važno znati mogu li se iste i prevenirati. Ako se ta mogućnost potvrdi, na taj bi se način moglo smanjiti širenje infekcija u dječjem kolektivu, smanjiti broj posjeta liječniku i učestalost bolovanja roditelja.

Koji su rizici?

Rizik uzimanja probiotika je vrlo mali što potvrđuju i stavovi Europskog povjerenstva za prehranu djece.

Odobrenja?

Navedenu studiju odobrio je Gradski ured za obrazovanje, kulturu i sport Grada Zagreba i Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Kome se obratiti za dodatne informacije?

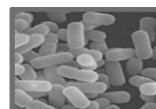
Sve dodatne informacije možete dobiti na:

Iva Hojsak, dr.med.

Klinika za dječje bolesti Zagreb

Tel. 01/4600-130

e-mail: ivahojsak@gmail.com



INFORMIRANI PRISTANAK

Upoznata/upoznat sam s primjenom probiotika i s prirodom samog pripravka.

Stoga pristajem da moje dijete tijekom tri mjeseca za vrijeme boravka u vrtiću uzima navedeni pripravak. Također sam upoznata/upoznat s istraživanjem i činjenicom da jedna skupina djece uzima placebo, odnosno fermentirani mliječni pripravak, a druga skupina djece fermentirani mliječni pripravak s probioticima.

Pristajem da se rezultati svi podaci dobiveni istraživanjem mogu koristiti u znanstvene svrhe, isključivo anonimno.

Ime i prezime djeteta_____

Ime i prezime roditelja ili skrbnika_____

Potpis roditelja ili skrbnika_____

Ime osobe koja me je upoznala s gore navedenim_____

Potpis_____

U Zagrebu, dana_____

Evidencijski obrazac o uzimanju pripravka, nuspojavama i infekcijama
za djecu u bolnici

Upitnik za djecu hospitaliziranu na Klinici za pedijatriju

Datum uključenja		
Datum rođenja		
Ime i prezime		
Grupa	A	B
Razlog hospitalizacije		

Nutritivni status:	Na početku	Na kraju
TM (kg) (Z score)		
TV (cm) (Z score)		

Intrahospitalna infekcija		
Gastrointestinalna infekcija	Da	Ne
Povraćanje	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Proljev	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Trajanje simptoma ukupno (br. dana)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Uzročnik (ako je otkriven)		

Respiratorna infekcija	Da	Ne
Dijagnoza		
Trajanje simptoma		
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Težina simptoma (VAS)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Uzročnik (ako je otkriven)		

Datum otpusta	
Trajanje hospitalizacije	

Nuspojave	
Datum	
Opis	

Neuključivanje u studiju zbog:
☐ **Zadovoljavanja kriterija neuključenja**

1. <12 mj
2. Imunodeficijencija
3. Alergija na KM
4. Uzima probiotike od ranije
5. Onkološki bolesnik
6. Odbojnost prema fermentiranim pripravcima
7. Hospitalizacija kraća od 3 dana

Redni broj kriterija neuključivanja: _____

☐ **Odbijanja sudjelovanja u studiji i nepotpisivanja informiranog pristanka**
NAPOMENE:

Molim označiti odgovarajuću kućicu te na punu crtu napisati redni broj kriterija neuključivanja

DATUM PRVOG DANA INTERVENCIJE: _____

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28

LEGENDA:

				
Popio svu količinu	Popio više od pola, ali ne sve	Popio manje od pola	Uopće nije pio	Nije ispunjena evidencija

DATUM ZADNJEG DANA INTERVENCIJE: _____

TRAJANJE INTERVENCIJE U DANIMA: _____

Upitnik ispunio (potpis):

Evidencijski obrazac o uzimanju pripravka, nuspojavama i infekcijama
za djecu u vrtiću

Upitnik za djecu u vrtiću

Datum uključenja		
Datum rođenja		
Ime i prezime		
Grupa	A	B

Nutritivni status:	Na početku	Na kraju
TM (kg) (Z score)		
TV (cm) (Z score)		

Infekcije		
I. Gastrointestinalna infekcija	Da	Ne
Povraćanje	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Proljev	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Trajanje simptoma ukupno (br. dana)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Uzročnik (ako je otkriven)		

II. Gastrointestinalna infekcija	Da	Ne
Povraćanje	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Proljev	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Trajanje simptoma ukupno (br. dana)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Uzročnik (ako je otkriven)		

III. Gastrointestinalna infekcija	Da	Ne
Povraćanje	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Proljev	Da	Ne
1. Dan - broj povraćanja/dan		
2. Dan - broj povraćanja/dan		
3. Dan - broj povraćanja/dan		
4. Dan - broj povraćanja/dan		
5. Dan - broj povraćanja/dan		
>5 dana		
Trajanje simptoma ukupno (br. dana)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Uzročnik (ako je otkriven)		

I. Respiratorna infekcija	Da	Ne
Dijagnoza		
Trajanje simptoma		
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Težina simptoma (VAS)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Uzročnik (ako je otkriven)		
II. Respiratorna infekcija	Da	Ne
Dijagnoza		
Trajanje simptoma		
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Težina simptoma (VAS)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Uzročnik (ako je otkriven)		
III. Respiratorna infekcija	Da	Ne
Dijagnoza		
Trajanje simptoma		
Vrućica	Da	Ne
Najviša temp. (°C)		
Težina simptoma (VAS)		
Uporaba antibiotika	Da	Ne
Uzročnik (ako je otkriven)		

Nuspojave	
Datum	
Opis	

Broj dana izostalih iz vrtića ukupno/zbog infekcije	
--	--

DATUM PRVOG DANA INTERVENCIJE: _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	53	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90

LEGENDA:

				
Popio svu količinu	Popio više od pola, ali ne sve	Popio manje od pola	Uopće nije pio	Nije ispunjena evidencija

DATUM ZADNJEG DANA INTERVENCIJE: _____

TRAJANJE INTERVENCIJE U DANIMA: _____

Upitnik ispunio (potpis):

12. ŽIVOTOPIS

Iva Hojsak rođena je u Osijeku 3. listopada 1978. godine gdje je završila osnovnu školu i I. gimnaziju. Godine 1997. upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala 2003. godine. Dobitnica je Rektorove nagrade 2003. godine. Obavezni staž, kao liječnik-pripravnik obavila je u KBC Zagreb, a stručni ispit za liječnike položila je 2004. godine u Ministarstvu zdravstva RH. Nakon toga radila je kao znanstveni novak na projektu „Celijakija u djece: dijagnostika, maligna alteracija, rast“ u Referentnom centru za dječju gastroenterologiju i prehranu, Klinike za dječje bolesti Zagreb. Specijalizaciju iz pedijatrije započela je 26. lipnja 2006. godine u Klinici za dječje bolesti Zagreb. Od 2007. godine je istraživač na projektu „Celijakija u djece: primarna prevencija i patogeneza kromosomske nestabilnosti“, voditeljice prof.dr.sc. Sanje Kolaček.

U svrhu znanstvene i stručne edukacije pristupnica je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima, a uspješno je završila i edukaciju iz: denzitometrije kostiju (2003. godine), Poslijediplomski studij „Zaštita majke i djeteta“ (2004-2005. godine), „ESPEN basic course of parenteral and enteral nutrition“ (2005. godine), edukaciju iz anorektalne manometrije i pH metrije jednjaka (2004-2007. godine). Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog gastroenterološkog društva, Hrvatskog društva za rijetke bolesti i Europskog udruženja za Crohnovu bolest i colitis (European Crohn and Colitis Organization (ECCO)). Objavila je 17 radova u indeksiranim časopisima, a od toga je 10 radova citirano u Current Contents-u te 16 kongresnih sažetaka. Godine 2009. dobila je nagradu Jean Rey za najbolje istraživanje u Europi iz područja dječje prehrane.